



REC'D 14 MAY 2004

WIPO

PCT

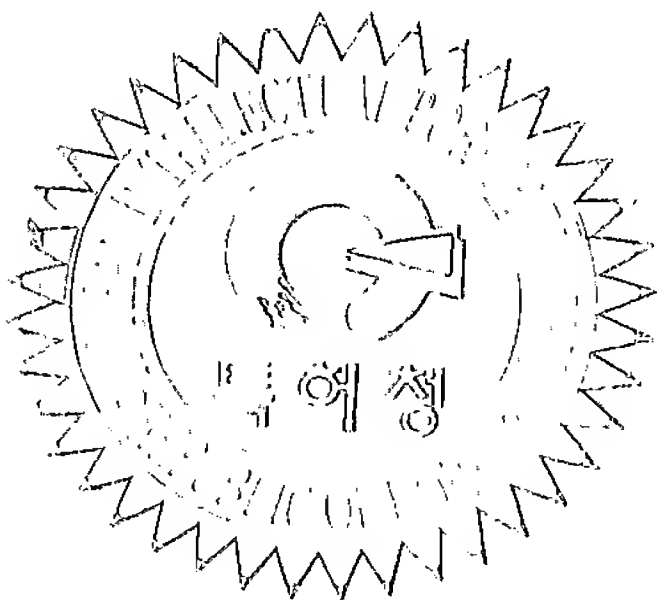
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0017691
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 03월 16일
Date of Application MAR 16, 2004

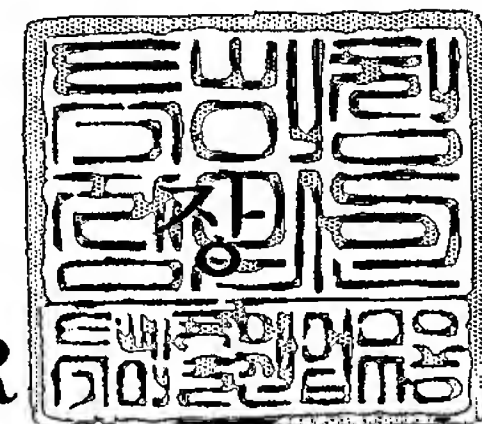
출원인 : (주)넥스젠
Applicant(s) Nexgen Biotechnologies, Inc.



2004 년 04 월 28 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.16
【발명의 명칭】	재조합 단백질의 제조 및 분리 방법
【발명의 영문명칭】	Method for Preparation and Purification of Recombinant Proteins
【출원인】	
【명칭】	(주)넥스젠
【출원인코드】	1-2000-021126-1
【대리인】	
【명칭】	특허법인 세신(대표변리사 최홍순,김경철)
【대리인코드】	9-2001-100004-2
【지정된변리사】	최홍순 ,김경철,양부현
【포괄위임등록번호】	2001-064645-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이선교
【성명의 영문표기】	LEE,Sun
【주민등록번호】	580212-1010414
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 108동 703호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유제근
【성명의 영문표기】	Y00,Jae Geun
【주민등록번호】	571007-1024114
【우편번호】	300-768
【주소】	대전광역시 동구 용전동 한숲아파트 112동 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장석소
【성명의 영문표기】	CHANG,Suxo
【주민등록번호】	580907-1696715

【우편번호】 441-853
【주소】 경기도 수원시 권선구 서둔동 25-41
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 3
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의
한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 특허법인 세신(
대표변리사 최홍순, 김경철) (인)
【수수료】
【기본출원료】 67 면 38,000 원
【가산출원료】 0 면 0 원
【우선권 주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 29 항 1,037,000 원
【합계】 1,075,000 원
【감면사유】 소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】 322,500 원
【첨부서류】 1. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 재조합 단백질의 생산, 분리 및 정제 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 내빙 단백질 (Anti-Freeze Protein, AFP)을 이용하여 외래 단백질을 안정적으로 분리 및 정제하여 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 AFP를 포함하는 재조합 단백질을 이용하여 외래의 목적 단백질을 생산, 분리 및 정제하는 방법 및 이와 관련한 컨스트럭트, 발현 벡터, 형질전환체 및 재조합 단백질을 제공한다. 본 발명을 통하여 생산된 재조합 단백질은 천연의 단백질과 동일한 생물학적 특성 및 기능을 나타낸다. 또한, 본 발명은 식물에서 유용 단백질의 발현 및 분리 정제에 특히 효율적이다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

내빙 단백질, 재조합 단백질, 형질전환, 분리

【명세서】

【발명의 명칭】

재조합 단백질의 제조 및 분리 방법{Method for Preparation and Purification of Recombinant Proteins}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 클로닝 부위의 5'쪽에 내빙단백질 (Anti-Freeze Protein, AFP) 또는 다양한 동일 기능유전자를 포함하는 컨스트럭트 (AFPN),

도 1b는 클로닝 부위의 3'쪽에 내빙단백질 또는 다양한 동일 기능유전자를 포함하는 컨스트럭트 (AFPC),

도 2a는 도 1a 및 도 1b의 컨스트럭트를 포함하는 식물발현용 벡터 pB1121AFPN 및 pB1121AFPC의 유전자 지도를 나타내는 모식도,

도 2b는 도 1a 또는 도 1b의 컨스트럭트를 포함하는 식물발현용 벡터 pRD400AFPN 및 pRD400AFPC의 유전자 지도를 나타내는 모식도,

도 3은 내빙 단백질을 포함하는 유전자 카세트가 클로닝된 벡터 pRD400AFPN 및 pRD400AFPC를 제한효소 *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단하여 전기영동한 결과를 나타내는 사진 (M, 1 kb DNA 래더; 레인 1, *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단한 pRD400AFPN 벡터; 레인 2, *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단한 pRD400AFPC 벡터; 레인 3, AFPN의 PCR 산물; 레인 4, AFPC의 PCR 산물),

도 4는 형광 단백질 (GFP)유전자가 클로닝된 pRD400AFPN 벡터를 제한효소 *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단하여 전기영동한 결과를 나타내는 사진 (M, 1 kb DNA 래더; 레인 1, *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단한 pRD400AFPN 벡터; 레인 2, *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단한 pRD400AFPC 벡터; 레인 3, GFP의 PCR 산물; 레인 4, GFP의 PCR 산물),

RI으로 절단한 GFP 유전자를 포함하는 pRD400AFP-GFP 플라스미드; 레인 2, 삽입 서열 AFP-GFP의 PCR 산물),

도 5는 벡터 도입 식물체에서 GFP의 발현 양상을 나타내는 사진: A는 야생형 담배, B는 유전자 도입 식물체 내에서 발현된 GFP에 의해 생성된 형광을 나타내는 식물세포,

도 6은 벡터 도입 식물체, 즉 일시적 형질감염 (transiently transfected) 식물체에서 발현된 AFP-GFP 단백질을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동한 결과 및 웨스턴 블롯 결과 사진 (A는 전기영동 사진, B는 웨스턴 블롯 사진; M, 분자량 마커; 레인 1, 야생종 담배의 단백질; 및 레인 2, 유전자 도입 식물체 내 발현된 GFP),

도 7은 얼음충전 칼럼을 이용한 AFP-GFP 재조합 단백질의 분리 및 정제를 나타내는 실험 결과 사진 (A는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동한 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-일시적 형질발현 식물체 내 발현되어 얼음충전 칼럼으로 분리 정제된 AFP-GFP, B는 A의 웨스턴 블롯 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-일시적 형질발현 식물체 내 발현되어 얼음충전 칼럼으로 분리 정제된 AFP-GFP),

도 8은 빙핵유발 물질을 이용한 AFP-GFP 재조합 단백질의 분리 및 정제를 나타내는 실험 결과 사진 (A는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동한 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-일시적 형질발현 식물

체 내 발현되어 요오드화은을 이용한 빙핵유발을 이용하여 분리 정제된 AFP-GFP; 레인 3-일시적 형질발현 식물체 내 발현되어 슈도모나스 시링게 균체를 빙핵으로 이용하여 분리 정제된 AFP-GFP, B는 A의 웨스턴 블롯 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-일시적 형질발현 식물체 내 발현되어 얼음충전 칼럼으로 분리 정제된 AFP-GFP; 레인 3-일시적 형질발현 식물체 내 발현되어 슈도모나스 시링게 균체를 빙핵으로 이용하여 분리 정제된 AFP-GFP).

도 9는 고장용액을 이용한 AFP-GFP 재조합 단백질의 분리 및 정제를 나타내는 실험 결과 사진 (A는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동한 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-250mM 수크로스 추출용액을 사용하여 분리 정제된 AFP-GFP; 레인 3-15% 수크로스 추출용액 (고장용액)을 사용하여 분리 정제된 AFP-GFP; B는 A의 웨스턴 블롯 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-250mM 수크로스 추출용액을 사용하여 분리 정제된 AFP-GFP; 레인 3-15% 수크로스 추출용액(고장용액)을 사용하여 분리 정제된 AFP-GFP).

도 10은 결빙조절 기기를 이용한 AFP-GFP 재조합 단백질의 분리 및 정제를 나타내는 실험 결과 사진 (A는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동한 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-일시적 형질발현 식물체 내 발현되어 결빙조절 기기를 이용하여 분리 정제된 AFP-GFP, B는 A의 웨스턴 블롯 결과 사진: M-분자량 마커; 레인 1-야생종 담배의 단백질 및 레인 2-일시적 형질발현 식물체 내 발현되어 결빙조절 기기를 이용하여 분리 정제된 AFP-GFP).

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <13> 본 발명은 단백질의 생산, 분리 및 정제 방법 및 이와 관련된 물(物)에 관한 것으로, 보다 상세하게는 내빙 단백질 (Anti-Freeze Protein, AFP)를 이용하여 외래 단백질을 안정적으로 분리·정제하여 생산하는 방법 및 이에 관련한 컨스트럭트, 벡터, 형질전환체 및 재조합 단백질에 관한 것이다.
- <14> 최근 들어 식물은 의료용 및 산업용 단백질의 대량생산 시스템으로 주목을 받고있다. 이는 기존에 확립되어 있는 전통적인 농업기반을 이용하여 쉽게 수확하고 가공할 수 있어 원하는 생물자원 (biomass)의 대량확보가 가능하기 때문이다. 또한 단백질 발현 시스템으로 주로 이용되었던 세균과 달리 식물체는 포유동물 단백질의 활성화에 필수적인 번역후-해독 수식 (posttranslational modification) 과정이 수행되는 진핵생물 단백질 합성 경로를 갖고 있어 (Cabanes-Macheteau *et al.*, *Glycobiology* 9:365-372(1999)), 식물체에서 발현된 단백질은 원핵 세포인 세균에서 발현된 단백질과 달리 진핵세포인 동물에서 발현된 단백질과 거의 동일하다고 할 수 있다.
- <15> 일반적으로 동물에서 유래한 재조합 단백질은 동물 세포주를 이용하여 생산이 되었지만 유지비용이 많이 들고 대량발현과 분리 정제의 어려움이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해서 대장균을 이용한 대량발현을 시도하였으나 전사효율이 낮거나 해독 효율이 낮은 등의 이유로 유전자의 발현 수율 자체가 낮아서 폴리펩타이드가 적게 생기거나 생성된 폴리펩타이드가

안정한 3차 구조를 이루지 못해 분해되기 쉽고, 또한 활성이 없는 형태로 응집되어 세포 내에서 봉입체 (inclusion body) 상태로 존재하는 문제가 있다. 그리고 대장균에 의한 1차 생산된 단백질을 2차 수식과정을 통하여 생물학적인 활성을 가지는 당단백질로 전환하는 시도들을 하였으나 수식효율이 낮고 2차 수식과정 단계의 고비용으로 인하여 산업적으로 활용하기에는 어려움이 있다.

- <16> 따라서 포유동물 단백질의 활성화에 필수적인 번역 후-해독 수식 과정이 수행되는 진핵생물 단백질 합성 경로를 갖고 있는 식물의 장점을 이용하여 식물에 유용 단백질 생산에 관여하는 유전자를 도입시켜 확보한 형질전환 식물체를 목적 단백질의 생산시스템으로 활용하는 방법이 현재 많이 활용되고 있다.
- <17> 식물에서 외래 단백질을 생산할 경우 숙주 식물체의 선발, 사용할 프로모터 및 식물체에 도입할 대상 유전자의 디자인 (해당 유전자의 식물 코돈화 및 인트론 제거) 등이 중요하며, 더불어 이와 같은 사항들을 고려하여 생산된 외래 단백질을 실질적으로 이용하기 위해서는 단백질의 분리 및 정제 방법이 매우 중요하다. 그러나, 현재까지 식물체에 발현된 단백질의 효율적인 분리 및 정제는 성공적으로 이루어지지 않고 있다.
- <18> 지구 생물환경은 약 80%가 15℃ 이하의 한랭한 지역으로 구성되어 있다. 대부분의 생물체는 빙점 이하의 저온에 오랜 시간 노출될 경우 결빙에 의한 세포질의 탈수 및 얼음결정의 형성으로 세포가 파괴되어 죽음에 이르게 된다. 그러나, 어류를 비롯한 극한지에서 생존하고 있는 생물은 세포질 내부에서 얼음결정의 형성과 성장을 억제하는 내빙단백질 (anti-freeze proteins, AFPs)을 합성하여 저온의 환경에서도 생존할 수 있는 능력을 가지고 있다. 지금까지 내빙단백질이나 내빙 당단백질은 한랭지의 물고기나 식물, 곤충, 곰팡이 및 세균에서 발견되었다 (Yamashita *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(2):239-247, (2002)).

- <19> 어류에서는 1 종의 내빙 당단백질(anti-freeze glycoproteins: AFGPs) 및 여러 종의 당화되지 않은 내빙 단백질 (AFP)이 발견되었으며, 아미노산 조성 및 구조에 의해 4 종류로 구분되었다 (Tomczak et al., Biophysical J., 82:874-881, (2002)).
- <20> 일반적으로 얼음의 결정은 물의 부착과 동결을 되풀이하면서 결정이 확대되어 나가지만, 내빙 단백질은 물의 결정표면에 부착하여 결정의 확대를 방지한다.
- <21> 본 발명은 내빙 단백질이 얼음 결정에 부착하는 성질을 이용하는 것으로서 재조합 방법에 의하여 목적 단백질을 제조하는 데에 있어서, 상기 목적 단백질에 내빙 단백질을 융합하여 목적 단백질의 분리 및 정제 방법을 개발하는 것을 목적으로 한다.
- <22> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <23> 본 발명자들은 식물체에서 발현시킨 외래의 단백질을 발현시키고 이를 효율적으로 분리할 수 있는 방법을 찾기 위하여 예의 연구 노력한 결과 발현하고자 하는 목적 단백질을 AFP 단백질에 융합시켜 발현하는 경우, AFP이 얼음에 부착되는 성질을 이용하여 발현된 재조합 단백질을 효율적으로 정제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- <24> 따라서, 본 발명의 목적은 내빙 단백질 (Anti-Freeze Protein, AFP)를 코딩하는 신규한 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 데 있다.
- <25> 본 발명의 다른 목적은 발현용 벡터의 일부를 이루는 뉴클레오타이드 컨스트럭트 (construct)를 제공하는 데 있다.
- <26> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 컨스트럭트를 포함하는 발현용 벡터를 제공하는 데 있다.
- <27> 본 발명의 다른 목적은 재조합 단백질을 일시적으로 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <28> 본 발명의 다른 목적은 재조합 단백질을 일시적으로 발현하는 일시적 형질감염 식물체를 제공하는 데 있다.
- <29> 본 발명의 다른 목적은 재조합 단백질을 안정되게 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <30> 본 발명의 다른 목적은 재조합 단백질을 안정되게 발현하는 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.
- <31> 본 발명의 다른 목적은 일시적 형질 감염된 식물을 반응기로 이용한 재조합 단백질의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <32> 본 발명의 다른 목적은 안정되게 형질전환된 식물을 반응기로 이용한 재조합 단백질의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <33> 본 발명의 다른 목적은 상술한 방법에 의해 재조합 단백질을 제공하는 데 있다.

<34> 본 발명의 또 다른 목적은 AFP를 재조합 단백질의 분리에 사용하는 방법을 제공하는 데 있다.

<35> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【발명의 구성】

<36> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 식물 발현에 적합하도록 변형된 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 내빙단백질 (AFP)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

<37> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 내빙단백질 (AFP) 코딩 서열, 프로테아제 절단 부위, 복수의 제한효소 인식 부위로 이루어진 멀티플 클로닝 사이트 및 정지 코돈이 순서대로 연결되어 있는 뉴클레오타이드 컨스트럭트 (construct)를 제공한다.

<38> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 복수의 제한효소 인식부위로 이루어진 멀티플 클로닝 사이트, 프로테아제 절단 부위, 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 내빙단백질 (AFP) 코딩 서열 및 정지 코돈이 순서대로 연결되어 있는 뉴클레오타이드 컨스트럭트를 제공한다.

- <39> AFP를 코딩하는 본 발명의 신규한 폴리뉴클레오타이드는 도 11의 천연형 AFP의 아미노산의 치환 없이 식물체내에서의 발현을 최적화하기 위하여 변형된 뉴클레오타이드 서열을 갖는다 (참조 서열목록 제 1 서열).
- <40> 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 디자인은 다음과 같은 기준에 의해 실시된다: (i) GC 함량을 45-50%로 하고, (ii) 식물이 선호하는 코돈을 갖도록 하며, (iii) 인트론 유사 서열을 제거하는 것이다. 이러한 식물-적합 서열은 유전자의 해독율 (translation rate)을 증가시킬 수 있다 (Kusnadi *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 14:149-155(1998)). 또한, 도입 유전자의 배열이 숙주 식물체에서 인트론으로 인식됨으로 인해 식물체 핵 내에서 절단되어 원하는 단백질의 생산에 실패할 가능성을 배제하기 위하여, 도입되는 외래 유전자 내의 인트론 유사 서열이 제거된다.
- <41> 본 발명의 신규한 폴리뉴클레오타이드는 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라, 얼음 결정(ice crystals)에 대한 상당한 친화성을 나타내는 범위 내에서 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 배열하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 배열된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 보다 바람직하게는 95%의 상동성, 가장 바람직하게는 98%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- <42> 본 발명자들은 기존의 식물 발현용 벡터에 AFP를 코딩하는 서열을 부가하여 식물체에서 발현된 외래단백질의 분리 및 정제가 용이하도록 한 식물 발현용 벡터를 개발하였다. 한편, AFP를 이용한 시스템은 현재까지 검증된 바가 없다.

- <43> 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 복수의 제한효소 인식 부위는 *NcoI*, *XbaI* 및 *BamHI* 인식부위들로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 2개의 인식부위를 포함하며, 가장 바람직하게는 상기 *NcoI*, *XbaI* 및 *BamHI* 인식부위들을 포함한다.
- <44> 본 발명의 컨스트럭트에서, 상기 프로테아제 절단 부위는 특정 인식 서열을 갖는 다양한 단백질 분해 효소에 대한 절단 부위가 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 엔테로키나제 절단 부위 또는 트롬빈 절단 부위이다.
- <45> 본 발명의 컨스트럭트에 포함되는 정지 코돈은 TAA, TGA 또는 TAG이며, 가장 바람직하게는 TAG이다.
- <46> 본 발명의 컨스트럭트는 5'-AFP 코딩 서열-프로테아제 절단 부위-멀티플 클로닝 사이트-정지 코돈-3'의 방향성 및 순서를 갖는 것이 바람직하다. 이러한 방향성을 갖는 경우에는 멀티플 클로닝 사이트에 삽입된 외래 서열에 의해 코딩되는 단백질의 N-말단에 AFP가 결합하게 된다 (참조 도 1a). 변형예로서, 5'-멀티플 클로닝 사이트-프로테아제 절단 부위-AFP 코딩 서열-정지 코돈-3'의 방향성 및 순서를 갖을 수도 있다. 이러한 경우에는, 발현되는 단백질의 C-말단에 AFP가 결합하게 된다 (참조 도 1b).
- <47> 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 상기 뉴클레오타이드 컨스트럭트들은 서열목록 제 2 서열 또는 제 3 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- <48> 본 발명의 컨스트럭트에 있어서, 멀티플 클로닝 사이트에는 제조하고자 하는 외래의 목적 단백질을 코딩하는 구조 유전자 서열이 삽입될 수 있다. 상기 목적 단백질을 코딩하는 구조 유전자 서열은 얻고자 하는 바람직한 형질에 따라 결정된다. 예컨대, 제초제 (글라이포세이트, 설폰닐우레아 등) 저항성 유전자, 바이러스 저항성 유전자, 해충 저항성 유전자 (예: Bt

유전자), 악조건 (가뭄, 기온, 염도) 저항성 유전자, 품질향상을 위한 유전자 (예; 당도 증가, 과숙 지연 등), 의료용 단백질 생산 관련 유전자(EGF, 각종 질병의 항원 또는 항체, 인슐린 등), 기능성 화장품 생산 관련 유전자 (알부민, 항균성 펩타이드 등) 등이 있다.

- <49> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (i) 상술한 뉴클레오타이드 컨스트럭트; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 컨스트럭트에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리 아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 식물발현용 벡터를 제공한다.
- <50> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상술한 본 발명의 뉴클레오타이드 컨스트럭트는 식물세포 발현용 벡터의 제조에 유용하다.
- <51> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, 콜리 플라우어 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 썬타아제 (nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤펠리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리블로오스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제 스몰 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 쌀 사이토졸 트리오포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스스의 아테닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.
- <52> 본 명세서에 있어서, 용어"작동적으로 연결되며"는 영문으로는 operably linked (또는 operatively linked)에 해당하며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 표현이다. 유전자의 발현

에 있어서 유전자 발현은 프로모터, 조직 특이적 조절 인자 및 인핸서를 포함하는 특정 조절 인자에 의해 조절되는데 이런 경우 유전자는 상기 조절 인자에 '작동적으로 연결되어 있다'라고 표현한다.

- <53> 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기하는 3'-비-해독화 부위는 아그로박테리움 튜머페이션스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것 (nos 3' end) (Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜머페이션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분 및 CaMV 35S 터미네이터를 포함한다.
- <54> 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자 (예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*), 등)를 포함한다.
- <55> 본 발명에 따르면, 식물 발현용 벡터가 도입된 식물체의 제조는 크게 두 방식에 의해 달성 된다: 일시적 형질감염 식물체 (transient transfected plant) 및 형질전환 식물체 (transgenic plant).
- <56> 본 명세서에서 용어 "일시적 형질감염 식물체"는 외래 유전자가 도입된 식물체로서 도입된 외래 유전자가 다음 세대로 전달되지 않는 것을 의미한다. 일시적 형질감염 식물체에서 외래 유전자는 일반적으로 숙주 세포의 염색체와 별개로 존재하게 된다. 반대로, 용어 "형질

전환 식물체"는 다음 세대로 전달되는 외래 유전자를 갖는 식물체를 의미한다. 형질전환 식물체에서 외래 유전자는 일반적으로 숙주 세포의 염색체에 통합 (integration)되어 숙주 세포의 유전 내용물 (genetic repertoire)이 되며, 다음 세대에 안정적으로 전달된다.

- <57> 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 본 발명의 식물발현용 벡터를 식물체의 식물세포로 도입되는 단계; 및 (b) 상기 식물세포에 유전자 도입이 되었는 지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 일시적 형질감염 식물체의 제조방법을 제공한다.
- <58> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기한 방법에 의해 제조된 식물발현용 벡터를 일시적으로 발현하는 일시적 형질감염 식물체를 제공한다.
- <59> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 본 발명의 식물발현용 벡터를 식물세포로 도입되는 단계; (b) 상기 식물세포에 유전자 도입이 되었는 지 여부를 확인하는 단계; 및 (c) 유전자가 도입된 식물세포를 포함하는 식물체로부터 리포터 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 외래 단백질의 제조방법을 제공한다.
- <60> 본 발명의 방법에 있어서, 식물세포의 일시적 형질감염은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다 (Rainer Fisher et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30:113-116(1999)). 식물에서의 일시적 유전자 발현은 안정된 발현을 하는 형질전환체에 비하여 신속하고 단백질 발현 결과를 빠른 시일 내에 확인할 수 있기 때문에, 안정된 형질전환 식물체를 사용한 대규모 생산에 앞서 식물체에서 수득한 목적 단백질의 정상적 기능 여부를 확인하는데 적합하다.

- <61> 이에 본 발명자들은 생물학적 활성을 가지는 외래 단백질의 효율적인 대량 생산을 위하여, 식물체에서 일시적 유전자 발현 방법을 사용하여 외래 단백질을 발현하고 분리 및 정제하였다.
- <62> 일시적 유전자 발현 방법은 대량 생산을 위해 식물 형질전환체를 제조하기 전에 목적 유전자의 기능성과 안정적 발현성을 검사하는데 적합한 접근방법으로서, 시간과 비용을 절약할 수 있는 이점이 있다. 특히, 안정적 형질전환에 의해 제조된 식물 형질전환체의 경우, 외래 유전자가 삽입된 위치에 따라 영향을 받는 염색체 위치효과 (chromosomal positional effect)를 나타내는 데, 일시적 형질감염은 이러한 효과를 배제할 수 있어 외래 유전자의 효과적 발현과 분리에 매우 적합하다.
- <63> 일시적 형질감염에서 외래 유전자를 식물세포로 전달하는 방법은 대표적으로 세 종류가 있다: 내이키드 (naked) DNA를 입자에 코팅하여 도입하는 입자총 (particle bombardment) 방법 (Christou, P., *Trends Plant Sci.* 1:423-431(1996)), 진공 침투 (vacuum infiltration) 등에 의하여 발현 벡터를 포함하고 있는 아그로박테리움을 식물조직으로 도입하는 아그로인필트레이션법 (agroinfiltration) (Kapila et al., *Plant Sci.*, 122:101-108(1996)), 및 변형된 식물 바이러스 벡터를 이용하는 바이러스벡터법 (viral vectors) (Scholthof, H. et al., *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:299-323(1996)).
- <64> 이들 세 가지 방법의 형질전환 효율은 각각 다양하여, 입자총에 의한 DNA 도입의 경우에는 일반적으로 소수의 세포들에만 유전자가 도입되며 전사를 위하여 DNA가 세포의 핵 내에 도달해야만 기능을 하게 된다. 이 방법은 안정적 형질전환에 앞서서 재조합 단백질의 안정성 검사에 사용할 수 있지만 재조합 단백질의 대량 발현을 위해서는 부적당하다.

- <65> 아그로인필트레이션법은 입자총보다 많은 세포들에 유전자가 도입될 수 있는데, 목적 유전자를 포함하는 T-DNA가 몇 가지 세균 단백질들의 도움으로 능동적으로 핵 내에 도입된다. 이 방법 또한 도입된 T-DNA가 숙주세포의 염색체로 통합되어 지속적으로 발현되는 것이 아니고, 핵 내에 독립적으로 존재하여 목적 유전자의 일시적 발현을 나타내는 것으로 단백질 안정성과 기능의 특성을 조사하기에 충분한 양의 단백질을 신속하게 확보하기에 적당하다.
- <66> 그리고 바이러스백터를 이용한 방법은 바이러스 식물 병원성 유전자 (viral plant pathogene)의 지놈에 외래 유전자를 도입하여 강한 프로모터의 조절을 받도록 하는 것으로서, 외래 유전자를 포함한 재조합 바이러스 백터를 식물에 감염시키면 도입된 외래 유전자는 식물 바이러스 복제 과정 중에 고효율로 함께 증폭된 후 발현이 이루어져 외래 단백질을 생산하게 된다. 그러나 바이러스 백터를 사용할 경우에는 생산할 단백질의 크기가 30 kDa 이하로 제한되어 있어 도입할 유전자의 크기가 커서는 사용하기가 어렵다는 단점이 있다.
- <67> 따라서, 본 발명에서는 아그로인필트레이션법이 가장 바람직하다. 아그로인필트레이션법은 일반적으로 잎을 가지고 실시된다.
- <68> 아그로인필트레이션법으로 본 발명이 실시되는 경우, 보다 바람직하게는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)-바이너리 벡터 시스템을 이용한다.
- <69> 상기한 구체적인 일 실시예에서, 적합한 잎은 발아된 종자로부터 유래된 어떠한 조직도 포함하며, 바람직하게는 꽃대가 오르기 전에 생성된 잎이고, 가장 바람직하게는 너무 어리거나 성숙하지 않은 잎이다. 잎이 어릴수록 발현량이 많으나 조직이 황화 되거나 죽기 쉬우며, 성숙한 잎은 조직이 팽창되어 있어 균의 주입은 쉬우나 발현량이 감소된다. 종자의 발아는 적합한 배지를 이용하여 적합한 암/광조건 하에서 실시된다.

- <70> 식물 세포로의 유전자 도입은 Ti 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움 튜머페이션스를 가지고 실시된다 (Depicker, A. et al., In Genetic Engineering of Plants, Plenum Press, New York (1983)). 보다 바람직하게는, pBin19, pRD400, pRD320 및 pHS737과 같은 바이너리 벡터 시스템이 이용된다 (An et al., "Binary vectors" In Plant Gene Res. Manual, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986); Jain, et al., *Biochem. Soc. Trans.* 28:958-961(2000)).
- <71> 아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 잎에 있는 식물세포로의 유전자 도입은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 유전자 도입 과정은 아그로박테리움 튜머페이션스의 배양물을 잎의 조직에 침투 (infiltration)시키는 과정을 포함한다.
- <72> 상기 침투 과정은 진공을 이용한 방법 또는 주사기를 이용한 방법으로 실시될 수 있다. 진공을 이용하는 경우의 구체적인 일 실시예는 다음과 같다. 식물체 잎을 아그로박테리움 튜머페이션스의 배양물에 넣고, 짧은 시간 동안 진공을 적용한다. 이어 진공을 빠르게 해제하고, 잎을 멸균수로 소독한 다음, 습한 종이 위에 잎의 윗 부분이 아래로 향하도록 놓는다. 그런 다음, 상기 잎을 약 22℃에서 약 16 시간의 광조건 하에서 보관한다. 그리고 나서, 약 2-3 시간 후, 발현된 목적 단백질의 확인한다.
- <73> 한편, 주사기를 이용하는 경우의 구체적인 일 실시예는 다음과 같다. 식물체 잎의 뒷면에 아그로박테리움 튜머페이션스의 배양물을 주사기를 이용하여 주입하고, 이 식물체를 약 3-5일 동안 배양한 다음, 발현된 목적 단백질을 확인한다.
- <74> 아그로박테리움 튜머페이션스 배양액에는 바람직하게는 아세토시링곤이 포함되는데, 이는 아그로박테리움의 식물로의 침투를 돕기 위한 것이다.

- <75> 본 발명에 따라 유전자 도입된 식물체는 당업계에 공지된 방법에 의해 목적 단백질의 발현을 확인된다. 예를 들어, 유전자 도입된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 식물 세포에 존재하는 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 유전자 도입 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)). 한편, 유전자 도입 시 이용되는 벡터에 β -글루쿠로니다아제 유전자가 있는 경우에는 유전자가 도입된 잎 조직의 일부를 X-gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indole- β -D-Glucuronic Acid) 등의 기질 용액에 침지시켜 발색되는 양상을 육안으로 관찰함으로써 유전자 도입 여부를 용이하게 확인할 수 있다 (Jefferson, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5:387(1987)).
- <76> 본 발명의 방법에 따르면, 일시적 형질감염 식물체를 이용함으로써 단기간에 저렴한 비용으로 외래 단백질을 생산할 수 있다.
- <77> 본 발명의 유전자 도입 식물체, 즉 일시적 형질감염 식물체의 조직 (예: 잎)으로부터 외래 단백질을 얻을 수 있으며, 상기 조직으로부터 얻은 추출액을 통상적인 정제과정을 거쳐 얻을 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 정제 단계는 당업계에서 통상적으로 이용되는 정제방법을 채용하여 실시할 수 있다. 예컨대, 암모늄 설페이트 또는 PEG 등을 이용한 용해도에 따른 분리 (solubility fractionation), 분자량에 따른 한외여과 분리, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 다양한 방법이 이용될 수 있고, 통상적으로는 상기한 방법의 조합을 이용하여 정제하게 된다.
- <78> 본 발명의 가장 바람직한 실시예에서, 본 발명의 발현되는 단백질의 N-말단또는 C-말단에 있는 AFP를 이용하여, 얼음 결정에 적용하여 소망하는 외래 단백질을 신속하고 용이하게 분리 및 정제할 수 있다.

<79> 하기의 특정된 실시예를 참조하여 분리 및 정제방법을 살펴보면, 다음과 같다:

<80> (1) 얼음이 충전된 칼럼을 이용한 대량 단백질 분리 및 정제

<81> AFP-GFP 유전자 (또는 GFP-AFP 유전자)가 도입된 식물조직에 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액 (예: 수크로스, Hepes, $MgCl_2$ 및 DTT)를 첨가하여 미세하게 간다. 추출액을 원심분리한 후 상등액을 취하여 새 튜브로 옮긴다. 이 용해된 세포용액을 얼음 결정이 함유된 칼럼에 첨가하여 흔들어주면서 세포용액내의 AFP-GFP 단백질 (또는 GFP-AFP 단백질)이 얼음 결정에 잘 흡착되도록 한 다음, 원심분리하여 얼음 결정을 수확한다. GFP 단백질이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 농축한다.

<82> (2) 빙핵유발 물질을 이용한 대량 단백질 분리 및 정제

<83> AFP-GFP 유전자 (또는 GFP-AFP 유전자)가 도입된 식물조직에 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액을 첨가하여 분쇄기로 식물조직을 미세하게 간다. 추출액을 원심분리한 후 상등액을 취하여 새 용기로 옮긴다. 이 용해된 세포용액이 들어 있는 용기를 저온베스 (Cold-bath)로 옮겨 수퍼쿨링 (Super cooling) 상태가 될 때까지 교반을 실시하고 빙핵형성 유발물질 (예: 요오드화은 또는 살아 있거나 죽은 상태의 슈도모나스 시링게 (*Pseudomonas syringae*) 균체)을 첨가한 후 전체 용액량의 2/3정도의 얼음결정이 형성될 때까지 지속적으로 교반하여 세포용액내의 AFP-GFP 단백질 (또는 GFP-AFP 단백질)이 얼음 결정에 잘 흡착되도록 한 다음, 원심분리하여 얼음 결정을 수확한다. AFP-GFP 단백질 (또는 GFP-AFP 단백질)이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 농축한다.

<84> (3) 고장용액을 이용한 대량 단백질 분리 및 정제

<85> AFP-GFP 유전자 (또는 GFP-AFP 유전자)가 도입된 식물조직에 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액을 첨가하여 분쇄기로 식물조직을 미세하게 간다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 고장용액을 제조하기 위하여 바람직하게는 수크로스를 사용하나 다양한 당당류, 이당류, 다당류 또는 당알코올을 사용할 수 있다. 고장액의 농도는 목적에 따라 다양하게 선택될 수 있으며, 바람직하게는 5%-50%이다. 추출액을 원심분리한 후 상등액을 취하여 새 용기로 옮긴다. 이 용해된 세포용액이 들어 있는 용기를 저온베스 (Cold-bath)로 옮겨 전체 용액량의 2/3정도의 얼음결정이 형성될 때까지 지속적으로 교반하여 세포용액내의 AFP-GFP 단백질 (또는 GFP-AFP 단백질)이 얼음 결정에 잘 흡착되도록 한 다음, 원심분리하여 얼음 결정을 수확한다. AFP-GFP 단백질 (또는 GFP-AFP 단백질)이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 농축한다.

<86> (4) 결빙조절 기기를 이용한 대량 단백질 분리 및 정제

<87> AFP-GFP 유전자 (또는 GFP-AFP 유전자)가 도입된 식물조직에 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액을 첨가하여 분쇄기로 식물조직을 미세하게 간다. 추출액을 원심분리한 후 상등액을 취하여 얼음 제조기기의 용기에 투입한 후 전체 용액량의 2/3정도의 얼음결정이 형성될 때까지 결빙처리한 후 결빙되지 않은 용액을 흘려 내린 후 약 0℃로 냉각시킨 추출완충액을 용기에 부어 얼음결정을 세척하여 목적하는 단백질 이외의 물질을 세척 제거한다. AFP-GFP 단백질 (또는 GFP-AFP 단백질)이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 농축한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 얼음 제조기기는 결빙속도를 조절할 수 있는 저온조절기능 및 교반기능이 장착된 기기이다.

- <88> 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 식물체를 제조하기 위한 다른 접근 방법은 외래 단백질을 안정적으로 발현하는 형질전환 식물체를 이용하는 것이다.
- <89> 따라서, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 식물발현용 벡터를 식물세포에 도입하는 단계; (b) 형질전환된 식물세포를 선별하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계를 포함하는 외래 단백질을 안정되게 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- <90> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기한 본 발명의 방법에 의해 제조된 외래 단백질을 안정되게 발현하는 형질전환 식물체를 제공한다.
- <91> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 식물발현용 벡터를 식물세포에 도입하는 단계; (b) 형질전환된 식물세포를 선별하는 단계; (c) 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계; 및 (d) 상기 형질전환 식물체로부터 외래 단백질을 수득하는 단계를 포함하는 외래 단백질의 제조방법을 제공한다.
- <92> 본 발명의 방법에 있어서, 식물세포의 형질전환은 당업계에서 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이는 전기천공 (Neumann *et al.*, *EMBO J.*, 1:841(1982) 및 Saul, M. *et al.*, *Plant Molecular Biology Manual*, Vol. A1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988)), 입자총 방법 (Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990) 및 Christou, *Trends Plant Sci.* 1:423-431(1996)) 및 아그로박테리움-매개 형질전환 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호)을 포함한다. 이 중에서, 아그로박테리움-매개 형질전환이 가장 바람직하다. 아그로박테리움-매개 형질전환은 일반적으로 잎 디스크, 그

리고 다른 조직 (자엽 및 배축)을 가지고 실시된다. 아그로박테리움-매개 형질전환은 쌍자엽 식물에서 가장 효율적이다.

- <93> 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제 (예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물 세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptII) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <94> 식물 원형질 또는 다양한 익스플란트로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다 (Bhojwani *et al.*, *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier Science, New York, (1983); 및 Lindsey, Ed., *Plant Tissue Culture Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, (1991)). 형성된 형질전환 발근 신탁은 적합한 식물 성장 배지에 치상된다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).
- <95> 한편, 본 발명자들은 신규한 형질전환 식물체 (예: 담배, 참외, 오이, 수박 및 유채)를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 특정 식물체의 형질전환을 위한 가장 효율적인 방법을 구축하였다. 이러한 방법은 PCT/KR02/01461, PCT/KR02/01462 및 PCT/KR02/01463에 개시되어 있으며, 상기 특허문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- <96> 본 발명의 방법은 다양한 식물체에 적용되지만, 바람직하게는 담배, 참외, 오이, 수박 및 유채에 적용된다.

- <97> 본 발명에 있어서, 바람직한 형질전환 방법은 아그로박테리움 시스템을 이용하여 실시되며, 보다 바람직하게는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)-바이너리 벡터 시스템을 이용하여 실시된다.
- <98> 상기한 구체적인 일 실시예에서, 형질전환에 적합한 익스플랜트는 발아된 종자로부터 유래된 어떠한 조직도 포함하며, 바람직하게는 자엽 및 배축이고, 가장 바람직하게는 자엽이다. 종자의 발아는 적합한 배지를 이용하여 적합한 암/광조건 하에서 실시된다. 식물 세포의 형질전환은 Ti 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움 튜머페이션스를 가지고 실시된다 (Depicker *et al.*, Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. In Genetic Engineering of Plants, Plenum Press, New York (1983)).
- <99> 보다 바람직하게는, pBin19, pRD400 및 pRD320과 같은 바이너리 벡터 시스템 이 이용된다 (An *et al.*, Binary vectors" In Plant Gene Res. Manual, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986)). 본 발명에 적합한 바이너리 벡터는 (i) 식물에서 작동하는 프로모터; (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 구조 유전자; 및 (iii) 폴리아데닐화 시그널 서열을 포함한다. 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자 (예: 루시페라아제 및 글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 바이너리 벡터에 이용되는 프로모터의 예는 CaMV 35S 프로모터, 1 프로모터, 2 프로모터 및 노팔린 썬타아제 (nos) 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <100> 아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 익스플랜트의 감염은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 감염 과정은 아그로박테리움 튜머페이션스의 배양물에 자엽을 함침시켜 공동배양하는 과정을 포함한다. 이에 의해 아그로박테리움 튜머페이션스는 식물 내로 감염된다.

- <101> 아그로박테리움 튜머페이션스에 의해 형질전환된 익스플랜트는 재분화 배지에서 재분화되며, 이는 신초의 재분화를 성공적으로 야기한다. 최종적으로, 발근 배지에서 재분화된 신초의 발근에 의해 형질전환 식물이 생산된다.
- <102> 본 발명에 따라 형질전환된 식물은 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인된다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 지놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)).
- <103> 형질전환체에서 발현된 외래 단백질은 형질전환 식물체의 다양한 기관 (예: 줄기, 잎, 뿌리, 열매, 종자 등)으로부터 유래된 조직으로부터 얻을 수 있으며, 상기 조직으로부터 얻는 추출액은 상술한 본 발명의 유전자 도입 식물체, 즉 일시적 형질감염 식물체의 조직 (예: 잎)으로부터 외래 단백질을 얻는 방법을 사용할 수 있다.
- <104> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 AFP이 얼음에 부착되는 성질을 이용하여 AFP를 재조합 단백질의 분리에 사용하는 방법을 제공한다: (a) 목적 단백질 및 AFP이 융합된 재조합 단백질을 얼음결정과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 얼음 결정을 회수하는 단계.
- <105> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 AFP는 식물, 곰팡이 또는 어류로부터 유래된 것이다 (참조: USP 6,096,867 및 WO 99/00493).

- <106> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 재조합 단백질의 분리에 사용되는 상기 AFP는 AFP의 전체 아미노산 서열뿐만 아니라 AFP 아미노산 서열 중 특히 얼음에 부착되는 도메인에 해당하는 서열이며, 상기 도메인 서열로도 동일한 효과를 얻을 수 있다.
- <107> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 재조합 단백질과 얼음결정의 접촉은 얼음이 충전된 컬럼에 재조합 단백질을 포함하는 용액을 로딩하여 이루어 질 수 있으며, 재조합 단백질을 포함하는 용액에 빙핵유발물질을 첨가하여 얼음결정을 생성시켜 접촉이 이루어지도록 할 수 있다.
- <108> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 얼음 결정의 회수에는 용액으로부터 고형물을 분리할 수 있는 통상의 방법 (예를 들어, 여과 또는 원심분리)이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 원심분리이다.
- <109> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 재조합 단백질은 다음의 단계를 포함하는 재조합 단백질을 발현하는 일시적 형질 감염체 또는 형질전환체의 제조 방법에 의하여 제조된 것을 특징으로 한다: (a) 목적 단백질을 코딩하는 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 내빙 단백질 (AFP) 코딩 서열이 연결되고 상기 목적 단백질 코딩 서열 및 내빙 단백질 코딩 서열 사이에 프로테아제 절단 부위가 포함된 컨스트럭트를 포함하는 발현용 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 발현용 벡터를 숙주로 도입하는 단계; 및 (c) 형질전환된 숙주를 선별하는 단계.
- <110> 상기 구현예에 있어서, 상기 프로테아제 절단 부위는 엔테로키나제 절단 부위 또는 트롬빈 절단 부위이다.

<111> 상기 구현예에 있어서, 상기 발현용 벡터는 식물, 동물 또는 미생물 발현용 벡터이다.

상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

<112> 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, p_L^{λ} 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* (예, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (p_L^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 숙주 세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 쉼린젠시스(*B. thuringiensis*)의 독소단백질 유전자의 프로모터 (*Appl. Environ. Microbiol.* 64:3932-3938(1998); *Mol. Gen. Genet.* 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λ gt4, λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

<113> 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다. 본 발명에 이용될 수 있는 진핵 세포용 발현 벡터는 당업계에 공지된 다양한 벡터로부터 선택할 수 있다. 예를 들어, YIp5, YCp19 및 소 파필로마 바이러스가 있다.

<114> 또한, 본 발명에서 이용되는 발현 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 앰피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있고, 바람직하게는 비용의 측면을 고려하여 앰피실린 또는 겐타마이신 내성 유전자가 있다.

<115> 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

<116> 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포 및 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 등이 이용될 수 있다.

<117> 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나의 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

<118> 상기 형질전환된 숙주를 선별하는 단계는 상술한 선택표지에 의해 발현되는 표현형 (phenotype)을 이용하여, 용이하게 실시할 수 있다. 예컨대, 상기 선택표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

<119> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<120> 실시예 : AFP 단백질의 신규 유전자의 합성

<121> 천연의 AFP 유전자와 동일하게 42개의 아미노산 (참조: 도 11)을 암호화하면서도, 기존의 AFP를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과는 다르게, 식물체 및 미생물이 선호하는 최적의 뉴클레오타이드 서열을 디자인하였다. 신규 유전자의 디자인 기준은, 첫째, GC 함량을 45-50% 이상으로 하고, 식물이 선호하는 코돈을 갖도록 하였으며, 그리고 인트론 유사 서열을 제거하는 것이다. 이렇게 디자인된 뉴클레오타이드 서열은 Plant Biotechnology Institute (이하 "PBI"로 표시), National Research Centre (SK, 캐나다)에서 화학적으로 합성하였다. 합성된 AFP 단백질을 코딩하는 DNA는 서열목록 제 1 서열에 기재되어 있다.

<122> 실시예 1: AFP를 포함하는 DNA 도메인의 합성

<123> 단백질 정제를 위한 AFP, 단백질 분리를 위한 트롬빈 절단 부위 (Thrombin sensitive site), 외래 유전자의 클로닝을 위한 멀티플 클로닝 사이트 (multiple cloning site) 및 종결 부위 (stop codon)로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 디자인하였다. 멀티플 클로닝 사이트는 외래 유전자의 클로닝을 위해 *Nco*I, *Xba*I 및 *Bam*HI의 3종의 효소 부위가 있으며, 단백질의 합성 종결을 위해 TGA 종결부위가 있다 (참조: 서열 목록 제 2 서열- *Nco* I + AFP typeI + Enterokinase + cloning site(*Xba*I+*Bam* HI) + TAG + *Bg*III; 5'-CC ATGGCTCT AGAGGATCCC CTCGTTCCAC GAGGATCTAT GGATGCTCCA GCTAAAGCAG CAGCAAAAAC AGCTGCAGAT GCAAAAGCTG CTGCTGCTAA AACTGCAGCA GATGCATTAG CTGCTGCTAA TAAACTGCA GCAGCTGCTA AAGCAGCTGC AAAA TAGA TCT-3', AFPN). 이렇게 디자인된 뉴클레오타이드 서열은 PBI, National Research Centre (SK, 캐나다)에서 화학적으로 합성하였다.

<124> 외래 유전자의 클로닝을 위한 멀티플 클로닝 사이트와 단백질 분리를 위한 트롬빈 절단 부위 (Thrombin sensitive site), 단백질 정제를 위한 AFP 및 종결부위 (stop codon)로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 디자인하였다. 멀티플 클로닝 사이트는 외래 유전자의 클로닝을 위해 *Nco*I, *Xba*I 및 *Bam*HI의 3종의 효소 부위가 있으며, AFP의 뒷부분은 단백질의 합성 종결을 위해 TGA 종결부위가 있다 (참조: 서열 목록 제 3 서열- *Nco* I + cloning site(*Xba*I+*Bam* HI) + Thrombin + AFP typeI + TAG + *Bg*III: 5'-CC ATGGATGCTC CAGCTAAAGC AGCAGCAAAA ACAGCTGCAG ATGCAAAAGC TGCTGCTGCT AAAACTGCAG CAGATGCATT AGCTGCTGCT AATAAACTG CAGCAGCTGC TAAAGCAGCT GCAAAAGACG ACGACGACAA GGCTCTAGAG GATCCATAGA TCT-3', AFPC). 이렇게 디자인된 뉴클레오타이드 서열은 PBI, National Research Centre (SK, 캐나다)에서 화학적으로 합성하였다.

<125> 실시예 2: AFP를 포함하는 식물 발현용 벡터들의 제작

<126> AFP 코딩 서열을 포함하는 상기 뉴클레오타이드 컨스트럭트에 있어서, AFPN은 165 bp, AFPC는 171 bp로 구성되어 있으며, 컨스트럭트의 5'-말단과 3'-말단은 각각 제한효소 *Nco*I과 *Bg*III 인식부위를 가질 수 있도록 합성되었다. 이는 상기 AFPN 또는 AFPC의 5'-측면 부위에 식물 발현용 35S 프로모터를 부착시키고 3'-측면 부위에 nos 터미네이터를 추가시켜 해당 유전자들이 식물에서 발현이 가능하도록 하기 위한 것이다. 즉, 35S 프로모터 및 nos 터미네이터 사이에 유전자 또는 유전자 카세트를 도입시킬 수 있는 클로닝사이트를 가지고 있는 pBI121의 클로닝사이트인 *Nco*I과 *Bam*HI에 클로닝하기 위한 것으로 *Nco*I은 *Nco*I과 상보적이며, *Bg*III는 *Bam*HI과 상보적인 제한효소로 클로닝 시 각각의 제한효소가 서로 결합이 된 후에는 제한효

소 인식부위가 제거되어 컨스트럭트에 포함되어 있는 클로닝 사이트를 효과적으로 이용할 수 있게 된다.

- <127> 상기와 같이 제작된 35S 프로모터, 165 bp 크기인 AFPN 합성 유전자와 nos 터미네이터가 연결되어 있는 유전자 발현카세트를 *Hind*III 및 *Eco*RI 효소로 함께 처리하여 절단한 후 분리, 정제하였다. 이 유전자 발현카세트를 식물 발현용 바이너리 벡터인 pRD400에 도입하기 위하여 pRD400을 제한효소 *Hind*III 및 *Eco*RI 효소로 함께 처리하여 절단한 후 분리, 정제하였다. 해당 DNA들의 정제, 회수 후 *Hind*III 및 *Eco*RI 효소로 함께 처리한 유전자 발현카세트 및 동일하게 절단된 pRD400 벡터를 혼합하고, 이 혼합물에 라이게이션 완충액 (KOSCO, 한국) 및 T4 리가아제 (KOSCO, 한국)를 첨가한 후 1시간 이상 16°C에서 반응 시켰다. 그런 다음, 반응물을 CaCl_2 로 처리된 컴피턴트 세포 (*E. coli* strain DH5 α ; Promega, 미국)에 형질전환시킨 후 항생제 카나마이신 (100 mg/ml)이 포함된 LB 배지에서 항생제 저항성 균주를 선별하였다.
- <128> 선발된 클론으로부터 알칼리 방법을 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하였고, 정방향 프라이머 5'-CCA TGG ATG CTC CAG CTA-3'과 역방향 프라이머 5'-AGA TCT ATG GAT CCT CTA-3'를 사용해서 증합효소연쇄반응 (PCR)을 실시하였다. PCR 증폭에서 이용된 효소는 Taq 증합효소 (솔젠트, 한국)이고, 온도 조건은 다음과 같이 세팅하였다: 96°C에서 2분간 전변성한 후, 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 연결반응, 72°C에서 2분간의 증합반응을 35회 반복하였고, 추가로 72°C에서 10분간 연장 반응을 하였다.
- <129> 이어, 증폭 생성물을 1.0% 아가로스 겔에서 분석하여 목적하는 인서트 서열이 플라스미드에 있음을 확인하였다 (참조: 도 3). 상기 AFP가 포함된 카세트 AFPN이 클로닝된 pRD400 벡터를 "pRD400AFPN"으로 명명하였다.

- <130> 또한 171 bp 크기인 AFPC 합성 유전에 대하여 상기의 방법과 동일하게 실험을 수행하여 하여 재조합 플라스미드를 확보하였으며 삽입유전자 AFPC를 확인하기 위하여 정방향 프라이머 5'-CCA TGG CTC TAG AGG ATC-3'과 역방향 프라이머 5'-ATC TAT TTT GCA GCT GCT-3'를 사용해서 중합효소연쇄반응 (PCR)을 실시하였다.
- <131> 증폭 생성물을 1.0% 아가로스 겔에서 분석하여 목적하는 인서트 서열이 플라스미드에 있음을 확인하였다 (참조: 도 3). 상기 AFP가 포함된 카세트 AFPC가 클로닝된 pRD400 벡터를 "pRD400AFPC"로 명명하였다.
- <132> 실시예 3: GFP 단백질 유전자의 식물 발현용 벡터의 제작
- <133> AFP 융합 외래 단백질의 발현 및 분리·정제를 확인하기 위하여 형광 단백질 (Green fluorescent protein, GFP)을 확인용 단백질로 사용하였다. 이를 위해 재조합 GFP를 코딩하는 818 bp의 GFP 유전자를 실시예 2에서 제작된 AFPN을 포함한 pRD400AFPN 벡터에 클로닝하였다.
- <134> 식물 발현용 벡터인 pRD400AFPN 및 GFP 유전자 (Genbank No. U87974)를 각각 제한효소 *Xba*I과 *Bam*HI 효소로 이중 절단한 후 분리·정제하였다. 상기의 절단된 GFP 유전자 및 pRD400AFPN 벡터를 혼합하고, 이 혼합물에 라이게이션 완충액 (KOSCO, 한국) 및 T4 리가아제 (KOSCO, 한국)를 첨가한 후 1시간 이상 16°C에서 반응 시켰다. 그런 다음, 반응물을 CaCl_2 로 처리된 컴피턴트 세포 (*E. coli* strain DH5 α ; Promega, 미국)에 형질전환시킨 후 항생제 카나마이신 (100 mg/ml)이 포함된 LB 배지에서 항생제 저항성 균주를 선별하였다.

- <135> 선발된 클론으로부터 알칼리 방법을 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하였고, 정방향 프라이머 5'-AGT AAA GGA GAA GAA CTT-3'과 역방향 프라이머 5'-TTT GTA TAG TTC ATC CAT-3'를 사용해서 중합효소연쇄반응 (PCR)을 실시하였다. PCR 증폭에서 이용된 효소는 Taq 중합효소 (솔젠트, 한국)이고, 온도 조건은 다음과 같이 세팅하였다: 96℃에서 2분간 전변성한 후, 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 연결반응, 72℃에서 2분간의 중합반응을 35회 반복하였고, 추가로 72℃에서 10분간 연장 반응을 하였다.
- <136> 이어, 증폭 생성물을 1.0% 아가로스 겔에서 분석하여 목적하는 GFP 유전자가 플라스미드 벡터에 클로닝 되었음을 확인하였다 (참조: 도 4).

<137> 실시예 4: 식물체로 식물발현용 벡터의 도입

<138> 실시예 4-1: 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 배양액의 제조

<139> 실시예 3에서 제작한 재조합 pRD400AFPN-GFP 벡터를 접합 (conjugation)에 의하여 아그로박테리움 튜머페이션스 GV3101(Mp90) (*Plant-cell-rep.*, 15(11):799-803(1996))에 도입하였다. 재조합 pRD400AFPN-GFP 벡터를 가진 대장균 S17-1 및 아그로박테리움 튜머페이션스 GV3101 (Mp90)를 각각 액체 LB배지에서 대수기까지 배양하였다. 이들 각각의 세포들을 에펜도르프 튜브에 1:1로 함께 혼합한 다음 30초간 원심 분리하여 세포들을 농축시킨 후 28℃에서 1-2일 동안 정치배양을 하였다. 시간이 경과한 세포들이 든 에펜도르프 튜브는 살살 흔들어서 주어 농축된 세포를 부유화시킨 다음, 50 mg/ℓ 카나마이신 및 30 mg/ℓ 겐타마이신이 첨가된 LB

고체배지에 도달한 다음, 28℃에서 2일 동안 배양한 후 콜로니를 선별하였다 (Alt-Morbe ., *J. Bacteriol.* 178:4248-4257(1996)).

<140> *pRD400AFPN-GFP*를 갖는 아그로박테리움 튜머페이션스를 액체 LB 배지에 접종한 후 28℃에서 2일간 배양하여 종균 (seed culture)으로 사용하였다. 충분히 배양된 종균을 액체 LB 배지에 최종 배양 볼륨의 1/50과 항생제 (50 mg/ℓ Kanamycin)를 넣고 600 nm에서 흡광도 1.5에 도달할 때까지 약 18시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 상온에서 3500 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 균체를 10 mM MgCl₂ 용액 (BA 0.2 ppm, 아세토시린곤 150 μM 함유)에 현탁한 후 3시간 이상 상온에서 적응시킨 후 식물체의 감염에 사용하였다.

<141> 실시예 4-2: 식물세포의 준비 및 아그로인필트레이션 (agroinfiltration)

<142> 먼저 소독한 담배 (*Nicotiana benthamiana*)의 종자를 파종하여 3 주 이상 배양한 후 온실에서 순화시켰다. 순화된 식물체의 잎사귀에 GFP 유전자를 가진 *pRD400AFPN-GFP* 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머페이션스 GV3101(Mp90)를 실시예 4-1에서 제시된 방법으로 감염용 배양액을 제조한 후 액을 바늘을 제거한 1 ml 주사기 ((주) 녹십자)에 삽입 후 이를 잎의 뒷면에 고르게 퍼질 때까지 주입하였다. 잎 전체에 균을 주입하면 잎이 무거워 식물체 자체가 쓰러지거나 엽병이 부러지는 경우가 발생할 수 있어 주의하여 주입하였다. 아그로박테리움이 주입된 식물체는 10분에서 1시간이 경과하면 원래의 상태를 회복하게 된다. 아그로박테리움이 주입된 식물체는 배양 3일이 경과한 후 5일 이내에 수확하여 실시예 5의 방법을 이용하여 분석하였다.

<143> 실시예 5: 유전자 도입 식물체에서 도입 유전자 발현 분석

<144> 상기 실시예 4에서 확보한 식물체의 유전자 발현 확인은 다음과 같이 실시하였다: GFP 유전자의 발현을 확인하기 위해 잎을 채취한 다음, 암실에서 휴대용 자외선 램프 (UV lamp, 장파장 길이 366 nm)를 이용하여 형광이 발색되는 지를 관찰하였다.

<145> 유전자가 도입된 잎의 세포들은 GFP가 발현되면 암상태에서 자외선을 조사하면 형광을 발하게 된다. 본 발명에서 유전자가 도입된 잎은 GFP 단백질이 발현되어 형광을 나타내어 유전자가 도입되어 발현되었음을 확인하였다 (참조: 도 5).

<146> 실시예 6: 유전자 도입 식물체에서 GFP 단백질의 분리 및 정제

<147> 실시예 6-1: 소량 단백질 분리 및 정제

<148> 적당량의 액체질소가 들어있는 막자사발에 GFP 유전자가 도입된 담배의 잎 1 g을 잘라서 넣고 식물조직을 분쇄하였다. 식물 생중량 0.5 g 당 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액 (250 mM 수크로스, 1 M Hepes, 1 mM $MgCl_2$ 및 1 mM DTT) 2 ml 를 첨가하여 미세하게 갈았다. 추출액을 12,000 rpm, 4°C에서 30분 이상 원심분리한 후 상등액을 취하여 새 튜브로 옮겼다. 이 용해된 세포용액을 얼음 결정이 함유된 칼럼에 첨가하여 0°C에서 30-60분간 약하게 흔들어주면서 세포용액내의 AFP-GFP 단백질이 얼음 결정에 잘 흡착되도록 한 다음, 500 x g에서 5분간 원심분리하여 얼음 결정을 수확하였다.

<149> GFP 단백질이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 센트리콘 (Amicon Co., U.S.A.)을 사용하여 농축하였다.

- <150> 도 6에 나타낸 바와 같이, AFP-GFP 단백질을 SDS-PAGE 겔 상에서 전기영동한 후 쿠마시블루 염색 결과, 야생형 담배에서는 검출되지 않는 31.1 kD의 AFP 융합 GFP 단백질이 세포 용출액에서 검출됨을 확인하였다.
- <151> 실시예 6-2: 얼음이 충전된 칼럼을 이용한 대량 단백질 분리 및 정제
- <152> 실시예 4-2에 의거하여 1 kg의 아그로인필트레이션 처리된 식물시료 또는 처리 후 동결 보존된 시료들을 0-4℃로 예냉 또는 해동한 후 식물 생중량 1 g 당 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액 (250 mM 수크로스, 1 M Hepes, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM DTT) 2 ml를 첨가하여 분쇄기로 식물조직을 미세하게 갈았다. 추출액은 12,000 rpm, 4℃에서 30분 이상 원심분리한 후 상등액을 취하여 새 용기로 옮겼다. 이 용해된 세포용액을 얼음 결정이 함유된 칼럼에 첨가하여 0℃에서 30-60분간 약하게 흔들어주면서 세포용액내의 AFP-GFP 단백질이 얼음 결정에 잘 흡착되도록 한 다음, 500 xg에서 5분간 원심분리하여 얼음 결정을 수확하였다.
- <153> AFP-GFP 단백질이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 쉐트리콘 (Amicon Co., U.S.A.)을 사용하여 농축하였다.
- <154> 도 7에 나타낸 바와 같이, AFP-GFP 단백질을 SDS-PAGE 겔 상에서 전기영동한 후 쿠마시블루 염색 결과, 야생형 담배에서는 검출되지 않는 31.1 kD의 AFP 융합 GFP 단백질이 세포 용출액에서 검출됨을 확인하였다.
- <155> 실시예 6-3: 빙핵유발 물질을 이용한 대량 단백질 분리 및 정제

- <156> 실시예 4-2에 의거하여 1 kg의 아그로인필트레이션 처리된 식물시료 또는 처리 후 동결 보존된 시료들을 0-4℃로 예냉 또는 해동한 후 식물 생중량 1 g 당 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액 (250 mM 수크로스, 1 M Hepes, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM DTT) 2 ml를 첨가하여 분쇄기로 식물조직을 미세하게 갈았다. 추출액은 12,000 rpm, 4℃에서 30분 이상 원심분리한 후 상등액을 취하여 새 용기로 옮겼다. 이 용해된 세포용액이 들어 있는 용기를 저온베스 (Cold-bath)로 옮겨 영하 1.8-7.0℃의 수퍼쿨링 (Super cooling) 상태가 될 때까지 교반을 실시하고 비용해성 요오드화인 (AgI) 분말을 첨가한 후 전체 용액량의 2/3정도의 얼음결정이 형성될 때까지 지속적으로 교반하여 세포용액내의 GFP 단백질이 얼음 결정에 잘 흡착되도록 한 다음, 500 x g에서 5분간 원심분리하여 얼음 결정을 수확하였다.
- <157> GFP 단백질이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 센트리콘 (Amicon Co., U.S.A.)을 사용하여 농축하였다.
- <158> 도 8에 나타낸 바와 같이, AFP-GFP 단백질을 SDS-PAGE 겔 상에서 전기영동한 후 쿠마시 블루 염색 결과, 야생형 담배에서는 검출되지 않는 31.1 kD의 AFP 융합 GFP 단백질이 세포 용출액에서 검출됨을 확인하였다.
- <159> 빙핵형성 유발물질로서 살아 있거나 죽은 상태의 빙핵유발 미생물 슈도모나스 시링게 (*Pseudomonas syringae*) 균체를 이용하였을 경우에도 요오드화인과 동일한 효과를 얻을 수 있었다.
- <160> 실시예 6-4: 고장용액을 이용한 대량 단백질 분리 및 정제

- <161> 실시예 4-2에 의거하여 1 kg의 아그로인필트레이션 처리된 식물시료 또는 처리 후 동결 보존된 시료들을 0-4℃로 예냉 또는 해동한 후 식물 생중량 1 g 당 단백질 분해효소 억제제-함유 추출완충액 (15% 수크로스, 1 M Hepes, 1 mM MgCl₂ 및 1 mM DTT) 2 ml를 첨가하여 분쇄기로 식물조직을 미세하게 갈았다. 추출액은 12,000 rpm, 4℃에서 30분 이상 원심분리한 후 상등액을 취하여 새 용기로 옮겼다. 이 용해된 세포용액이 들어 있는 용기를 저온베스 (Cold-bath)로 옮겨 전체 용액량의 2/3정도의 얼음결정이 형성될 때까지 지속적으로 교반하여 세포용액내의 AFP-GFP 단백질이 얼음 결정에 잘 흡착되도록 한 다음, 500 xg에서 5분간 원심분리하여 얼음 결정을 수확하였다.
- <162> AFP-GFP 단백질이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 센트리콘 (Amicon Co., U.S.A.)을 사용하여 농축하였다.
- <163> 도 9에 나타낸 바와 같이, AFP-GFP 단백질을 SDS-PAGE 겔 상에서 전기영동한 후 쿠마시 블루 염색 결과, 야생형 담배에서는 검출되지 않는 31.5 kD의 AFP 융합 GFP 단백질이 세포 용출액에서 검출됨을 확인하였다.
- <164> 실시예 6-5: 결빙조절 기기를 이용한 대량 단백질 분리 및 정제
- <165> 실시예 6-3 및 6-4에 의거하여 대량의 단백질 분리 및 정제를 실시하는 경우에 있어 기존의 얼음슬러시 제조기기 (ice slush maker)와 같이 결빙속도를 조절할 수 있는 저온조절 및 교반기능을 장치한 기기를 사용하여 용이하게 대량의 단백질을 분리 및 정제할 수 있었다.
- <166> 실시예 6-3 및 6-4에 의거하여 준비된 추출액 4500 ml을 얼음 제조기기 (세아산업, 한국)의 용기에 투입한 후 전체 용액량의 2/3정도의 얼음결정이 형성될 때까지 약 70분간 결빙처리

한 후 결빙되지 않은 용액을 흘려 내린 후 0℃로 냉각시킨 추출완충액 1000 ml을 용기에 부어 얼음결정을 30초간 2회 세척하여 목적하는 단백질 이외의 물질을 세척 제거하였다.

<167> AFP-GFP 단백질이 흡착된 얼음 결정을 동량의 인산완충용액으로 용해한 후 용출된 단백질을 센트리콘 (Amicon Co., U.S.A.)을 사용하여 농축하였다.

<168> 도 10에 나타낸 바와 같이, AFP-GFP 단백질을 SDS-PAGE 겔 상에서 전기영동한 후 쿠마시 블루 염색 결과, 야생형 담배에서는 검출되지 않는 31.1 kD의 AFP 융합 GFP 단백질이 세포 용출액에서 검출됨을 확인하였다.

<169> 실시예 7: 유전자 도입 식물체에서 GFP 단백질의 웨스턴 분석

<170> 상기 실시예 6의 방법으로 정제된 재조합 GFP 단백질들에 브래드포드 (Bradford) 방법에 의해 염색제 (Protein assay kit, Bio-Rad)를 넣고 UV-분광광도계로 595 nm에서 흡광도를 측정하고 BSA (Bovine Serum Albumin) 표준물질과 비교해서 단백질 정량을 실시하였다. 추출된 단백질은 양이 동일하도록 조정하여 각 시료를 8% 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 하였고, 이에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다 (참조: Peter B. Kaufma et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 108-121, CRC press). 웨스턴 블롯 분석은 아래와 같은 방법으로 시행되었다. 상기 SDS-PAGE 겔에 있는 단백질을 Semi-Dry Transfer Units (Hoefer, 미국)를 이용하여 PVDF 막으로 이동시켰다. 겔에 있는 단백질 전부가 PVDF 막에 이동한 것을 확인한 다음 PVDF막을 건조시켰다. 이 PVDF막을 재조합 GFP 단백질 항원에 특이적으로 반응하는 단일클론 항체 (Clontech, 미합중국)가 첨가된 0.5% BSA/TBS (Tris-Buffered Saline) 용액에 1시간 동안 반응시킨 다음 TBS 용액으로 PVDF 막을 5분씩 세 번 세척하였다.

그런 다음 퍼옥시다아제 표지 2차 항체 (peroxidase labelled-anti rabbit IgG, KPL, U.S.A.)와 1시간 동안 반응시킨 후 다시 TBS 용액으로 PVDF 막을 10분씩 세 번 세척하였다. 마지막으로 ABTS 발색기질액 (KPL, U.S.A.)이 첨가된 완충액에 PVDF 막을 넣고 실온에서 30분간 반응시켜 발색시킨 후 그 결과를 판독하였다. 도 6, 도 7, 도 8, 도 9 및 도 10에서 확인할 수 있듯이, 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과 상기 결과와 동일하게 31.1 kD의 재조합 GFP 단백질이 확인되었다.

<171> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<172> 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 재조합 방법을 이용한 단백질의 생산, 분리 및 정제 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 AFP를 이용하여 외래 단백질을 안정적으로 분리 및 정제하여 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 AFP를 포함하는 재조합 단백질을 이용하여 외래의 목적 단백질을 생산, 분리 및 정제하는 방법 및 이와 관련한 컨스트럭트, 발현 벡터, 형질전환체 및 재조합 단백질을 제공한다. 본 발명을 통하여 생산된 재조합 단백질은 천연의 단백질과 동일한 생물학적 특성 및 기능을 나타낸다. 또한, 본 발명은 식물에서 유용 단백질의 발현 및 분리 정제에 특히 효율적이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 내빙단백질 (AFP)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

【청구항 2】

서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 내빙단백질 코딩 서열, 프로테아제 절단 부위, 복수의 제한효소 인식부위로 이루어진 멀티플 클로닝 사이트 및 정지 코돈이 순서대로 연결되어 있는 뉴클레오타이드 컨스트럭트 (construct).

【청구항 3】

복수의 제한효소 인식부위로 이루어진 멀티플 클로닝 사이트, 프로테아제 절단 부위, 서열목록 제 1 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 내빙단백질 코딩 서열 및 정지 코돈이 순서대로 연결되어 있는 뉴클레오타이드 컨스트럭트.

【청구항 4】

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 멀티플 클로닝 사이트는 *NcoI*, *XbaI* 및 *BamHI* 인식부위들로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 2개의 인식부위를 포함하는 것을 특징으로 뉴클레오타이드 컨스트럭트.

【청구항 5】

제 2 항에 있어서, 상기 프로테아제 절단 부위는 엔테로키나제 절단 부위인 것을 특징으로 하는 뉴클레오타이드 컨스트럭트.

【청구항 6】

제 3 항에 있어서, 상기 프로테아제 절단 부위는 트롬빈 절단 부위인 것을 특징으로 하는 뉴클레오타이드 컨스트럭트.

【청구항 7】

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 정지 코돈은 TAG인 것을 특징으로 하는 뉴클레오타이드 컨스트럭트.

【청구항 8】

제 2 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 컨스트럭트는 서열목록 제 2 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오타이드 컨스트럭트.

【청구항 9】

제 3 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 컨스트럭트는 서열목록 제 3 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오타이드 컨스트럭트.

【청구항 10】

(i) 목적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 멀티플 클로닝 사이트에 삽입된 상기 제 2 항 또는 제 3 항의 뉴클레오타이드 컨스트럭트; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 컨스트럭트에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 식물발현용 벡터.

【청구항 11】

다음의 단계를 포함하는 재조합 단백질을 일시적으로 발현하는 일시적 형질감염 식물체의 제조방법:

- (a) 상기 제 10 항의 식물발현용 벡터를 식물체의 식물세포로 도입되는 단계; 및
- (b) 상기 식물세포에 유전자 도입이 되었는지 여부를 확인하는 단계.

【청구항 12】

상기 제 11 항의 방법에 의해 제조된 재조합 단백질을 일시적으로 발현하는 일시적 형질감염 식물체.

【청구항 13】

다음의 단계를 포함하는 일시적 형질 감염된 식물을 반응기로 이용하는 재조합 단백질의 제조방법:

- (a) 상기 제 10 항의 식물발현용 벡터를 식물세포로 도입되는 단계;
- (b) 상기 식물세포에 유전자 도입이 되었는지 여부를 확인하는 단계; 및
- (c) 유전자가 도입된 식물세포를 포함하는 식물체로부터 재조합 단백질을 수득하는 단계

【청구항 14】

다음의 단계를 포함하는 재조합 단백질을 안정되게 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법:

- (a) 상기 제 10 항의 식물발현용 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;
- (b) 형질전환된 식물세포를 선별하는 단계; 및
- (c) 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

【청구항 15】

상기 제 14 항의 방법에 의해 제조된 재조합 단백질을 안정되게 발현하는 형질전환 식물체.

【청구항 16】

다음의 단계를 포함하는 형질전환된 식물을 반응기로 이용한 재조합 단백질의 제조방법:

- (a) 상기 제 10 항의 식물발현용 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;
- (b) 형질전환된 식물세포를 선별하는 단계;
- (c) 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계; 및
- (d) 상기 형질전환 식물체로부터 재조합 단백질을 수득하는 단계.

【청구항 17】

상기 제 13 항 또는 제 16 항에 따라 제조된 재조합 단백질.

【청구항 18】

제 13 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 재조합 단백질을 수득하는 단계는 얼음이 충전된 칼럼을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 19】

제 13 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 재조합 단백질을 수득하는 단계는 요오드화인 결정 또는 살아 있거나 죽은 상태의 빙핵유발 미생물 슈도모나스 시링게(*Pseudomonas syringae*) 균체를 포함하는 빙핵유발물질을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 20】

제 13 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 재조합 단백질을 수득하는 단계는 단당류, 이당류, 다당류 또는 당알코올을 포함하는 고장용액을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 21】

제 13 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 재조합 단백질을 수득하는 단계는 결빙속도를 조절할 수 있는 저온조절기능 및 교반기능이 장착된 결빙조절 기기를 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 22】

상기 제 19 항 또는 제 20 항의 방법은 결빙속도를 조절할 수 있는 저온조절기능 및 교반기능이 장착된 결빙조절 기기를 추가적으로 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 23】

(a) 목적 단백질 및 AFP이 융합된 재조합 단백질을 얼음결정과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 재조합 단백질이 부착된 얼음 결정을 회수하는 단계를 포함하는 AFP가 융합된 재조합 단백질의 분리 방법.

【청구항 24】

제 23 항에 있어서, 상기 AFP는 식물, 곰팡이 또는 어류로부터 유래된 것을 특징으로 하는 분리 방법.

【청구항 25】

제 23 항에 있어서, 상기 AFP는 AFP 아미노산 서열 중 일함에 부착되는 도메인인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

【청구항 26】

제 23 항에 있어서, 상기 재조합 단백질은 다음의 단계를 포함하는 재조합 단백질을 발현하는 형질전환체의 제조 방법에 의하여 제조된 것을 특징으로 하는 분리 방법:

- (a) 목적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 내빙 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 연결되고 상기 목적 단백질 코딩 서열 및 내빙 단백질 코딩 서열 사이에 프로테아제 절단 부위가 포함된 컨스트럭트를 포함하는 발현용 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 발현용 벡터를 숙주로 도입하는 단계; 및
- (c) 형질전환된 숙주를 선별하는 단계;

【청구항 27】

제 26 항에 있어서, 상기 프로테아제 절단 부위는 엔테로키나제 절단 부위 또는 트롬빈 절단 부위인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

【청구항 28】

제 26 항에 있어서, 상기 발현용 벡터는 식물, 동물 또는 미생물 발현용 벡터인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

【청구항 29】

제 26 항에 있어서, 상기 숙주는 식물, 동물 또는 미생물의 세포이거나, 식물체 또는 동물체인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

【도면】

【도 1a】

AFPN



- I. 내빙단백질 유전자 또는 동일 기능유전자
II. 엔테로기나아제 인식부위: Asp Asp Asp Lys
gac gac gac aag
III. 클로닝 부위: GCTCTAGAGGATCCATAGATCT
XbaI BamHI stop BglII

【도 1b】

AFPC

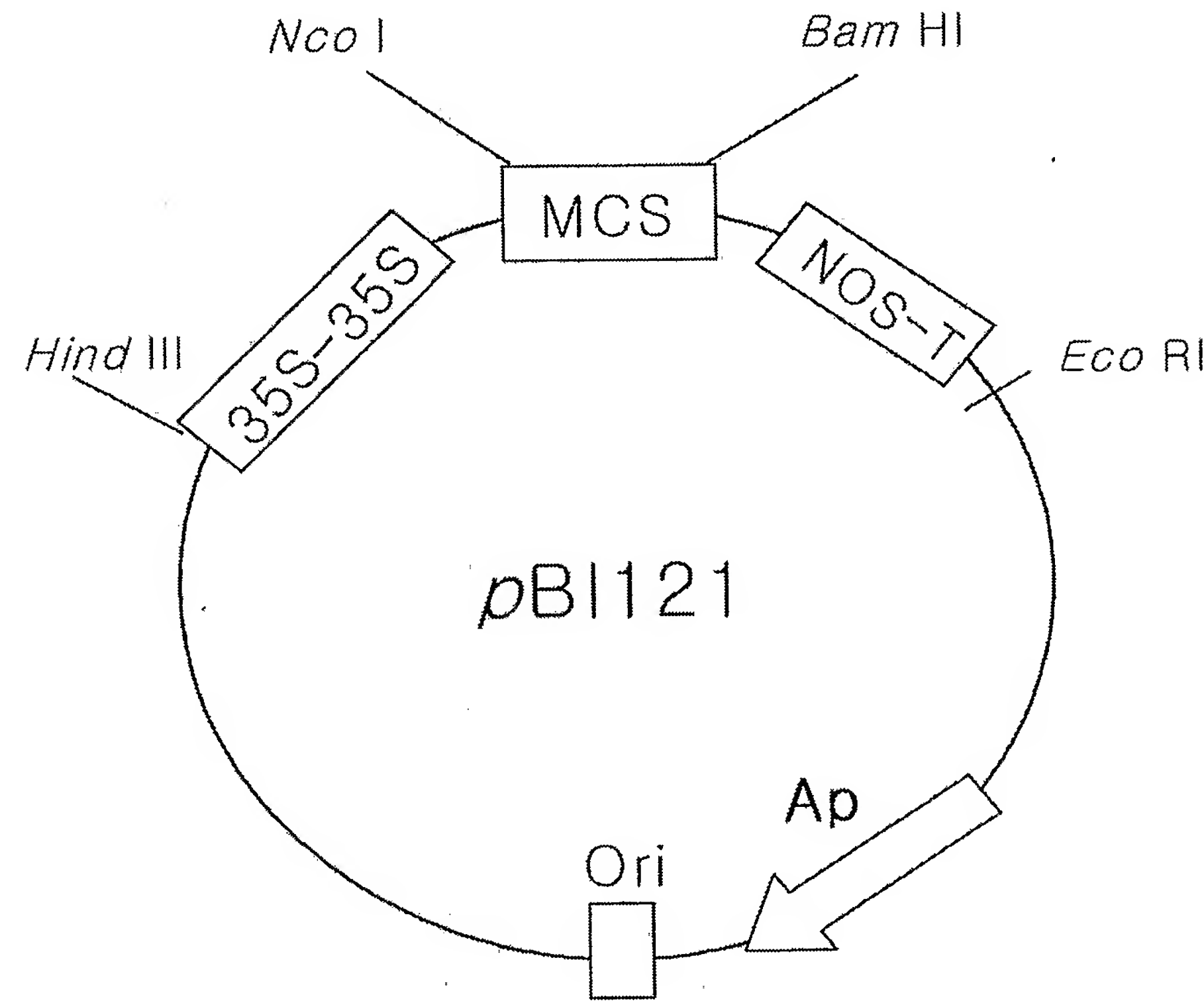


- I. 내빙단백질 유전자 또는 동일 기능유전자 + TAGA TCT
stop Bg/II
- II. 트롬빈 인식부위: Leu Val Pro Arg Gly Ser
c ctc gtt cca cga gga tct
- III. 클로닝 부위: CCATGGCTCTAGAGGATCCA
NcoI XbaI BamHI I

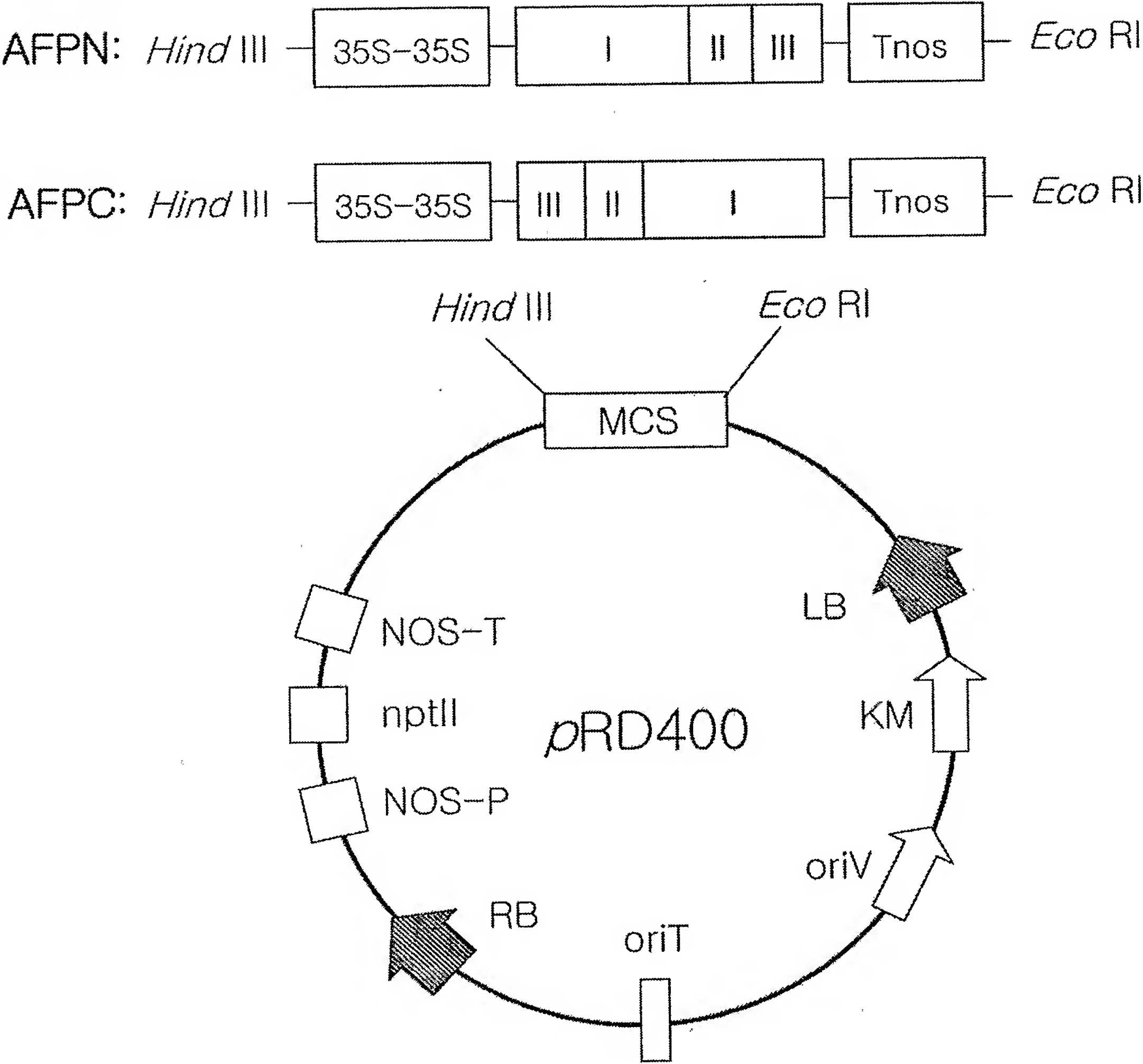
【도 2a】

AFPN: *Nco*I I II III *Bgl*II

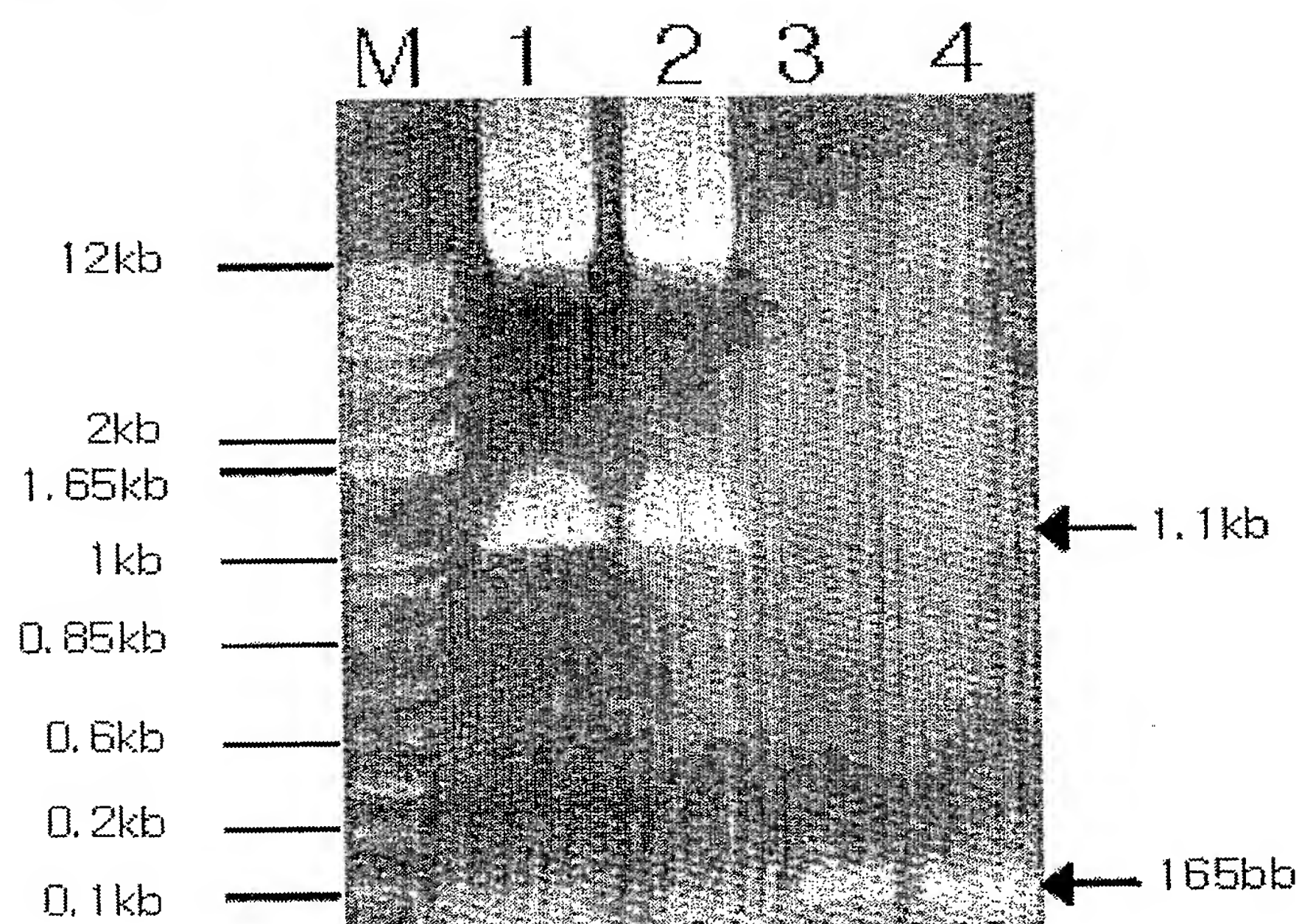
AFPC: *Nco*I III II I *Bgl*II



【도 2b】

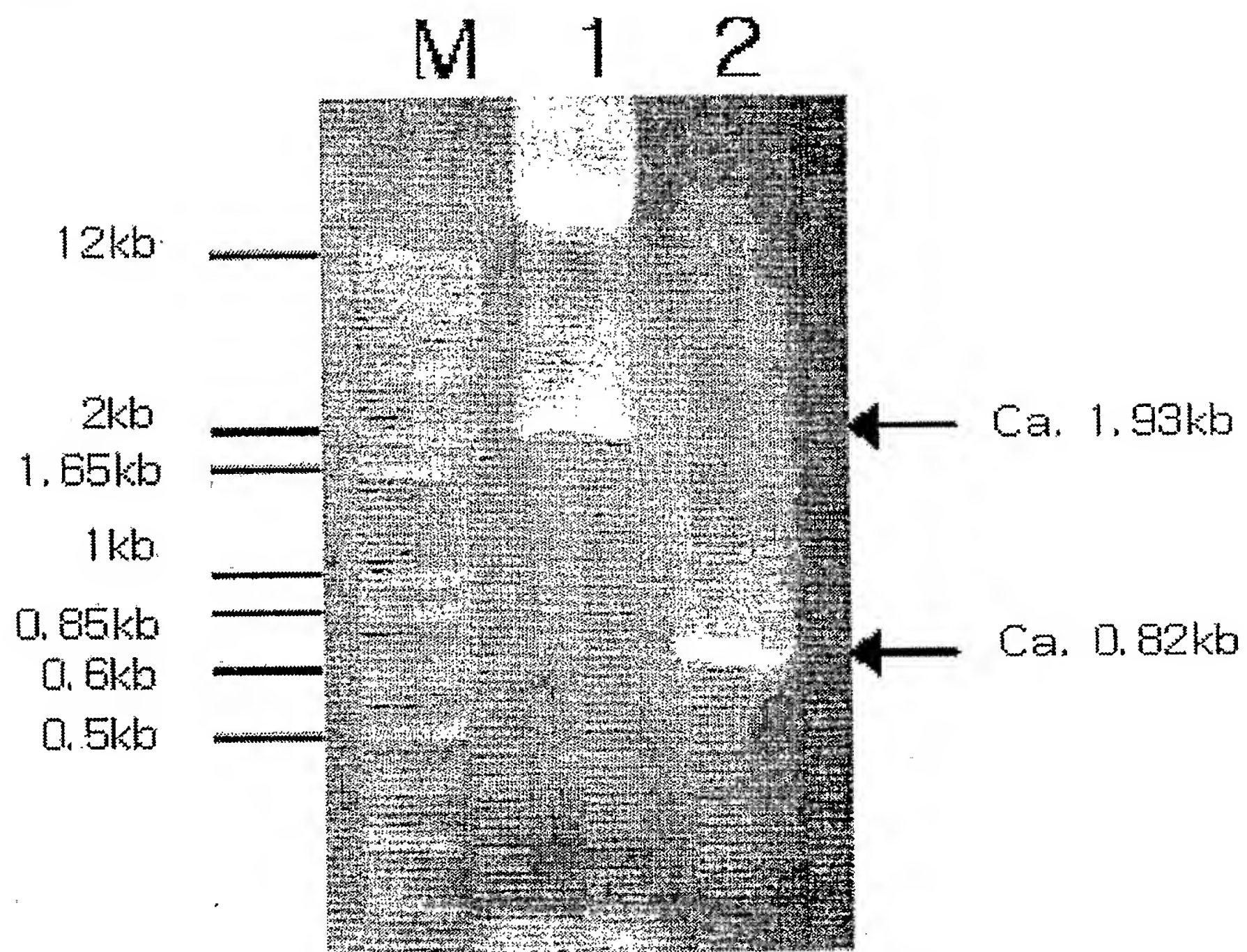


【도 3】



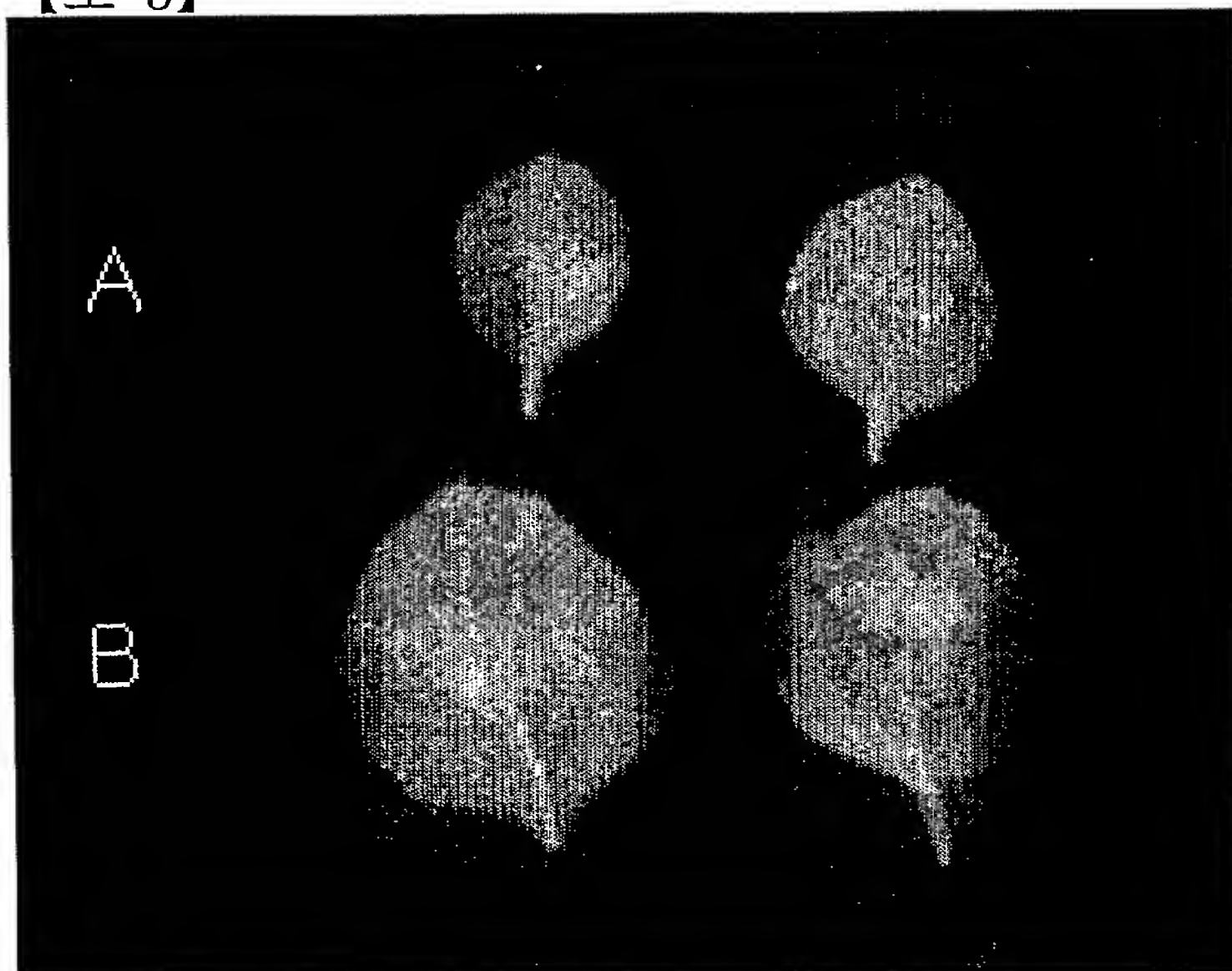
M: 1 kb DNA ladder
1: ρ RD400AFP_N(/HindIII, EcoRI)
2: ρ RD400AFP_C(/HindIII, EcoRI)
3: AFP_N PCR product
4: AFP_C PCR product

【도 4】



M: 1kb DNA ladder
 1: pRD400AFPN-GFP
 (HindIII, EcoRI)
 2: AFPN-GFP PCR product

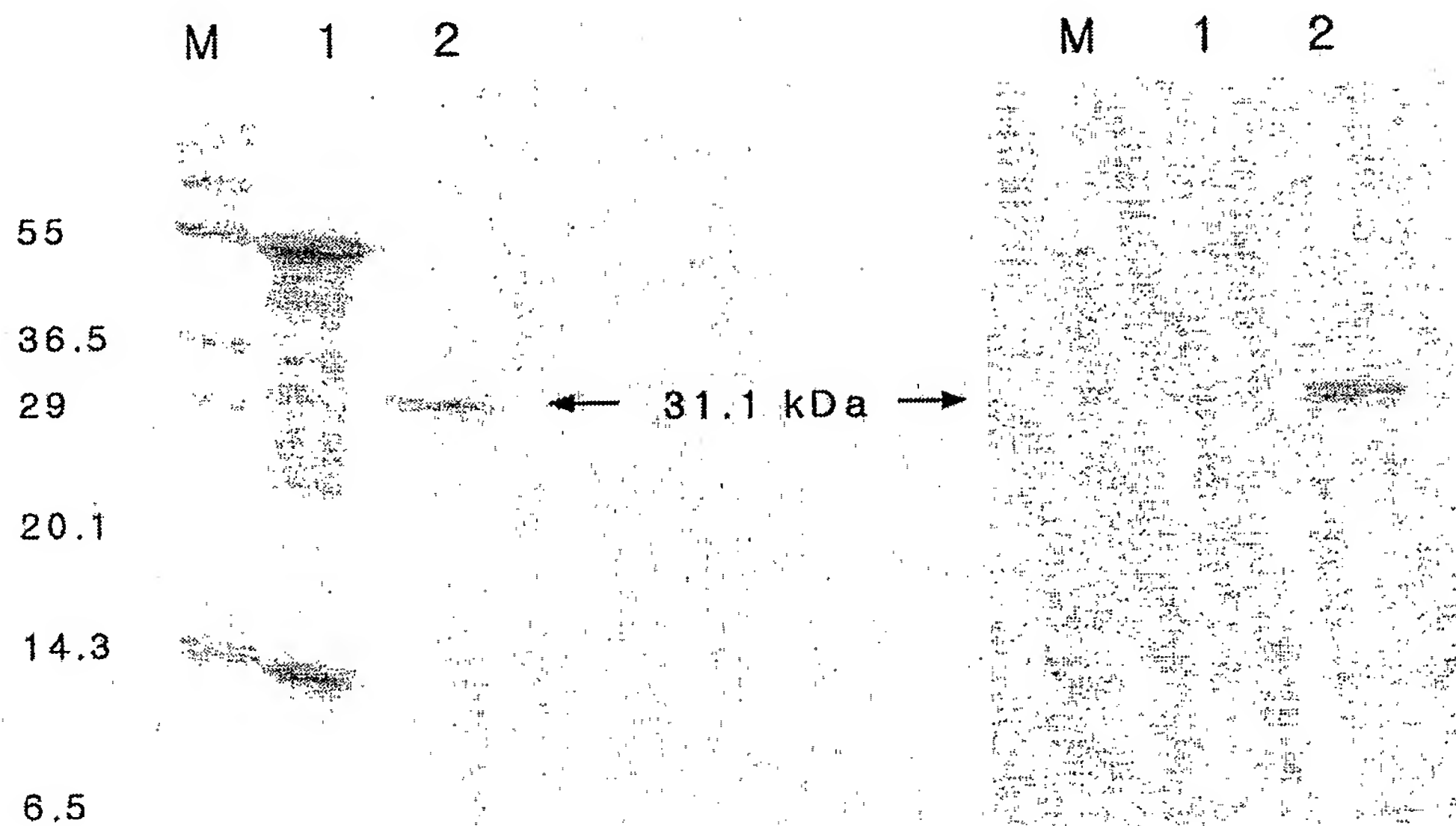
【도 5】



【도 6】

A: SDS-PAGE

B: WBA

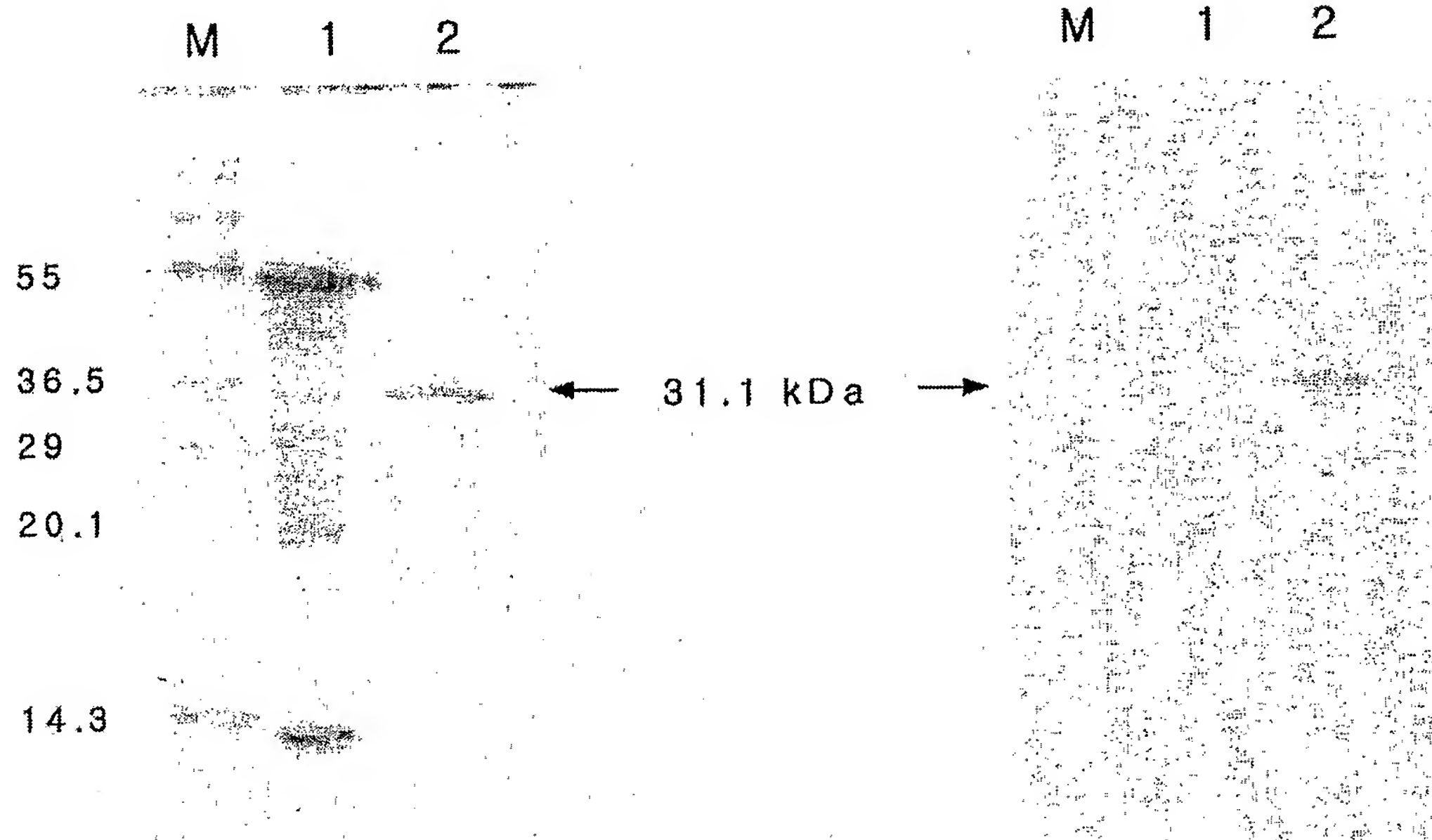


M : Molecular weight marker, 1 : Wt, 2 : AFP + GFP

【도 7】

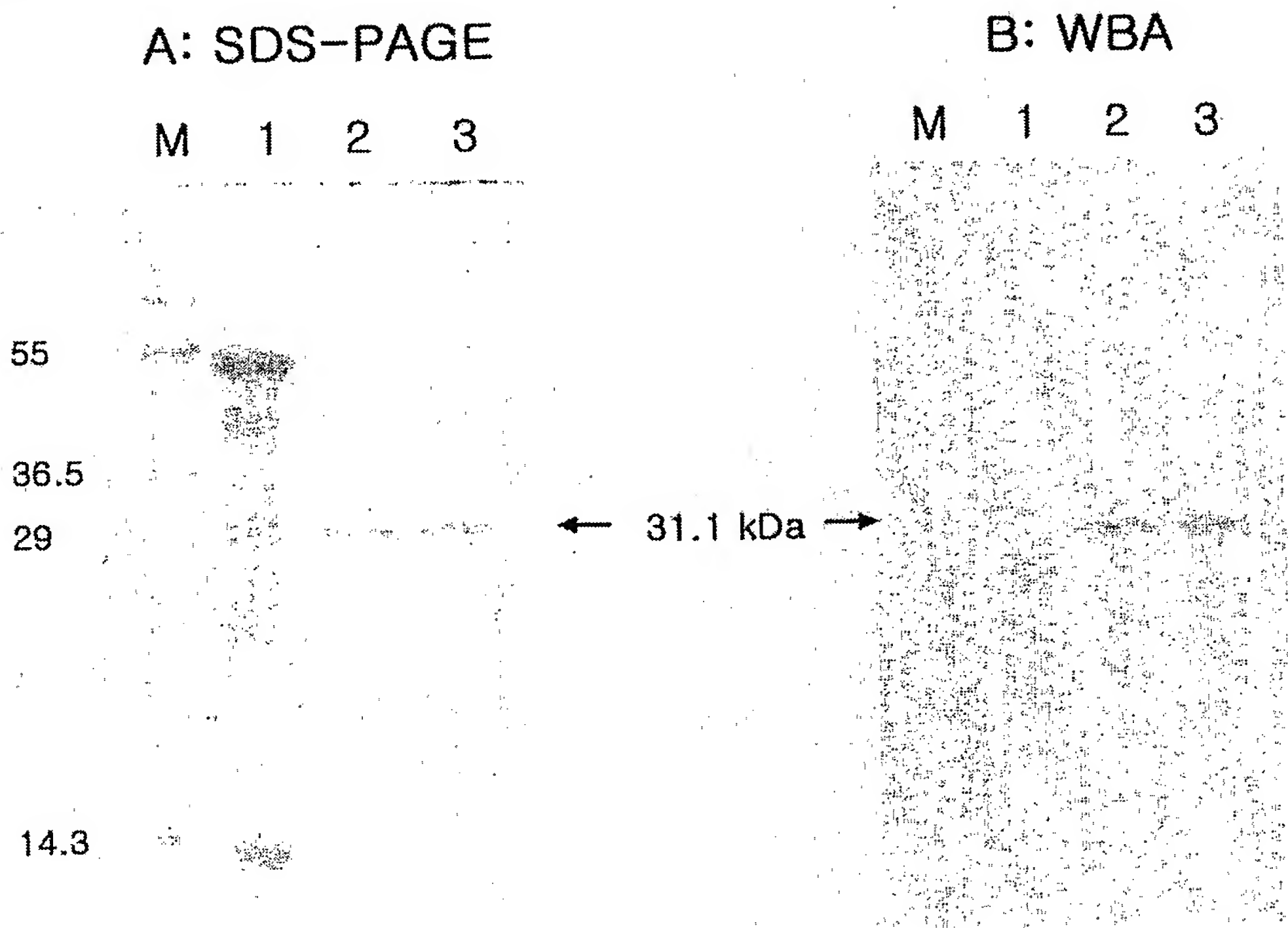
A: SDS-PAGE

B: WBA



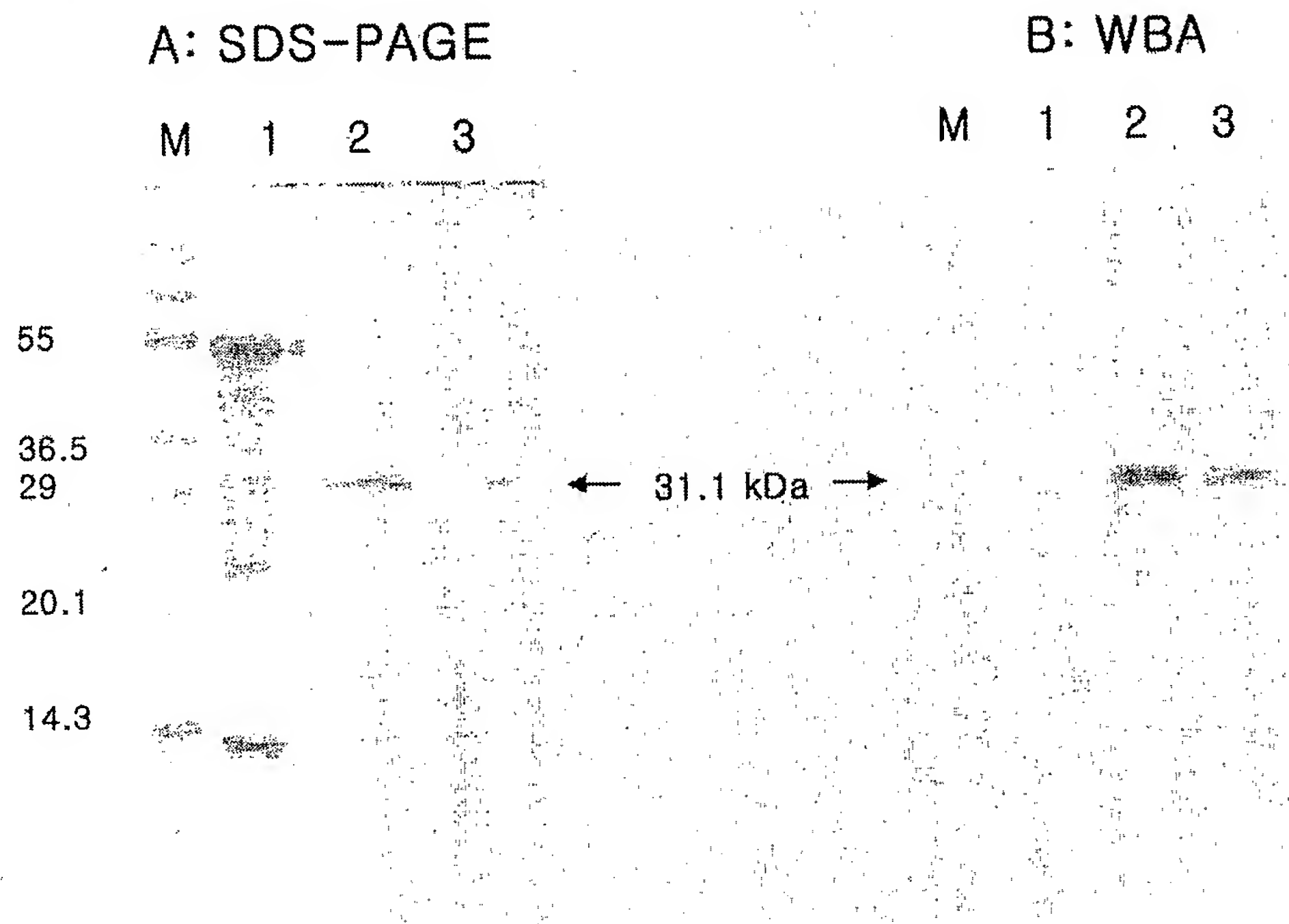
M : Molecular weight marker, 1 : Wt, 2 : AFP+GFP

【도 8】



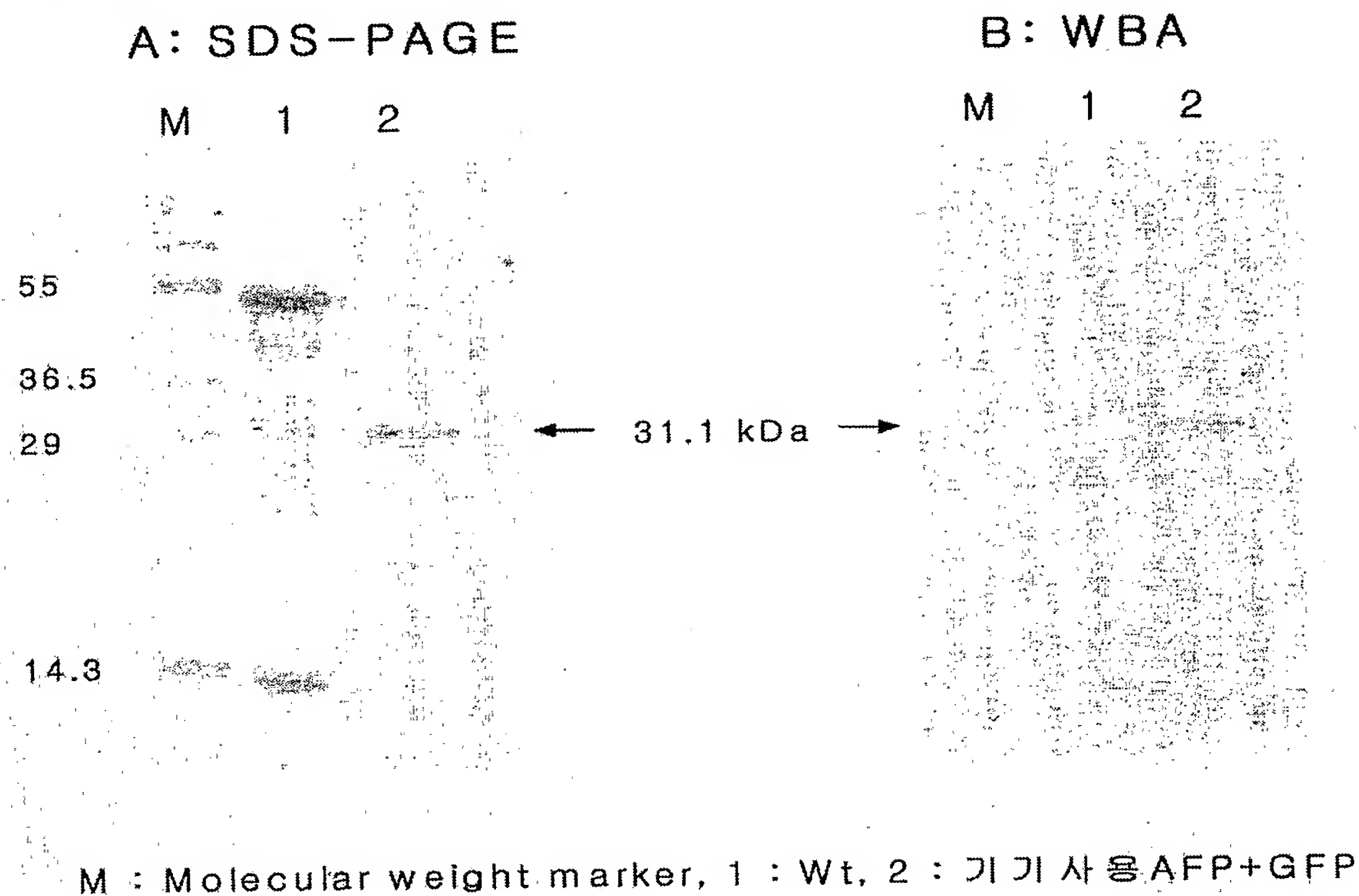
M : Molecular weight marker, 1 : Wt, 2 : 요오드화은을 이용한 AFP+GFP,
3 : Pseudomonas syringe를 방핵으로 이용하여 정제한 AFP+GFP

【도 9】



M : Molecular weight marker, 1 : Wt, 2 : 250 mM Sucrose, 3 : 15% Sucrose

【도 10】



【도 11】

MDAPAKAAK TAADAKAAAA KTAADALAAA NKTAATAKAA AK

【서열목록】

<110> Nexgen Biotechnologies, INC <120> Method for Preparation and Purification of Recombinant
Proteins <160> 3 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 126 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> optimized AFP nucleotide sequence <400> 1 atggatgctc cagctaaagc agcagcaaaa
acagctgcag atgcaaaaagc tgctgctgct 60 aaaactgcag cagatgcatt agctgctgct aataaaaactg cagcagctgc
taaagcagct 120 gcaaaa 126 <210>
2 <211> 165 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> AFPN nucleotide sequence

comprising AFP nucleotide sequence <400> 2 ccatggatgc tccagctaaa gcagcagcaa aaacagctgc agatgcaaaa
gctgctgctg 60 ctaaaactgc agcagatgca ttagctgctg ctaataaaac tgcagcagct gctaaagcag 120
ctgcaaaaga cgacgacgac aaggctctag aggatccata gatct 165 <210> 3 <211> 171 <212:
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> AFPC nucleotide sequence comprising AFP nucleotide sequenc
<400> 3 ccatggctct agaggatccc ctcgttccac gaggatctat ggatgctcca gctaaagcag 60 cagcaaaaac
agctgcagat gcaaaagctg ctgctgctaa aactgcagca gatgcattag 120 ctgctgctaa taaaactgca gcagctgcta
aagcagctgc aaaatagatc t 171

